

疾病との関係が明瞭に検証されていることが重要である。代行マーカーの適格性について検証が十分でない場合には、上に記した注意点を考慮しながら総合的に代行マーカーの選択の妥当性を示すことが期待され、さらに規制当局による科学的アドバイスも参考となるだろう。

### 3.2 同等性／同質性評価に必要とされる要件の違い

以前に記したように、臨床試験において必要とされるデータの種類の種類は製品の種類と使用経験によって変わるだろう。しかし、製造方法の変更の質の違いによっても、必要とされるデータの違いが生じる場合がありうる。

- ・ 詳細に製品の特性が明らかにできない、あるいは分子多様性のように検出不能ではあるが製造工程の変更によって当然生じると思われるような製品の特性の相違
- ・ 同等性／同質性の検討の過程で当然であると予想されたり、また実際に相違が検出されるような変更前の製品との特性の相違

#### 3.2.1 特性解析できない品質の差

品質の変化が予測されるものの、その変化の特性がわからない場合、製品の有効性および安全性について、変更前の製品と比較しながら、臨床試験によって変化の特性を明らかにする必要がある。

有効性に差があると思われる場合は、通常、差を示すことが最も検討を容易にするために有益である。臨床効果との関係について統計学的な面も考慮しながら、許容できる同等性の範囲について設定すべきである。

もしも代行マーカーがある場合、薬物動態学的／薬力学的研究はその要求を充たす上で適当かもしれない。このような場合、適切な感度を示す用量範囲を設定して検討すべきである（ICH E10 トピック参照）。代行マーカーの選択の妥当性を示し、同等性／同質性を定義する値を事前に設定し、さらにその値が妥当であることを示すべきである。

適当な代行マーカーがなく、関連する追加前臨床データあるいは臨床データもない場合は、臨床上的エンドポイントを指標とする臨床試験が必要とされよう。試験の感度については、試験をデザインする中で確認し、さらに許容範囲を定義し、その妥当性を示さなければならない。

#### 3.2.2 品質の差の特性が解析されている場合

有効性／安全性への影響は製品によって変わるの、詳細なガイダンスを示すことはできない。しかし一般には、品質の差に関する特性解析が十分になされている場合には、その情報は臨床試験の必要性について合理的に考える上で有用な背景情報となる。質的な面でも量的な点においても、相違のタイプと程度に関する情報が得られていれば、例えば臨床試験として免疫原性試験のみが必要であるという結論の妥当性を示すことができるかもしれない。十分な

受容体相互作用の研究と有用な薬理学的情報が得られていれば、有効性データが必要と思われる場合でも、有効性臨床試験の代行マーカーとして生物学的同等性を用いることの妥当性を示すことができるかもしれない。さらに重要な差と重要でない差の区別は有用といえよう。

差が重要ではなく、インビトロ生物活性にも差がないような場合は、バイオアベイラビリティデータおよび／または薬力学的試験による比較で十分かもしれない。

差が重要である時、例えば糖鎖パターン、あるいはインビトロ活性における差がある場合は、他に適当な理由がなければ、同等性に関する臨床試験が必要である。

活性物質のアミノ酸一次配列における変化は、通常は重要と考えられ、かつ受け入れることができない品質上の問題とみなされる。この場合は前臨床試験、あるいは臨床試験によって解決できるものではなく、同等性／同質性評価の範囲外の問題となりうる。

### 3.3 臨床上的安全性と医薬品安全性情報の必要性

ケースバイケースではあるが、定期的な医薬品安全性情報の更新報告（periodic safety update reports: PSURs）の周期が改訂される場合がある。PSURsには、製造方法の変更を細かく述べた章が含まれるが、製造方法の変更による製品の安全性への影響の可能性については、この中の関連項目（例えば、総合的安全性評価における免疫原性、有効性の欠除の可能性）で考察されるべきである。同等性／同質性評価に関連した安全性情報に関する申請者からのコメント（フォローアップ手段あるいは義務）は、この情報の中に記載されるべきものである。

### 3.4 非臨床および／あるいは臨床データが必要とされるタイミング

状況に応じて変わるものの、変更が承認される前と後との臨床データは、市販後調査義務として利用できるようにすべきである。

製品の有効性および／または安全性に対する製造方法の変更の影響に関連する非臨床データがある場合、承認前に提出されるべきである。

免疫原性試験データに関しては、5.2 節 有効成分および剤形の変更 を参照すること。

## 4. 既に市販されている他の製品との同等性が主張される製品の場合

この補遺の中で用いられている「同等性／同質性」の概念は 2001/83/EC の 条項 10(1)(a)において扱われている “essential similarity 本質的に同様” の概念とは異なるものである。“本質的に同様” の概念は別のクライテリアであり、この補遺の適用範囲の中にはない。

本質的には、申請者は申請時に申請様式を完全に充たす必要がある。しかしながら、二つの方法が可能である。

- ・ 製薬メーカーが自分自身で製品を開発することを選択する
- ・ 製薬メーカーが、製品がすでに市販されている他の製品との同等性を主張し、同等性/同質性を示すことを選択する

製薬メーカーはその選択の妥当性を申請書類の中で述べ、製品の開発を開始する前に EMEA にコンタクトすべきである。

#### 4.1 第一のケース（製造メーカーは自分自身で製品を開発することを選択する）

この場合は、品質、安全性、有効性に関連するガイドラインを考慮に入れながら、開発計画をたてる。データは製品を評価するために行われる研究と実験によって得られる。同等性/同質性試験は、既に市販されている製品との関係において行われるので、文献上のデータを製品の有効性と安全性を支持するために用いることはできない。

文献上のデータを用いることができないので、既存の製品が一つ以上の適応症がある場合においては、すべての適応症への有効性を示さなければならない。

十分な安全性データが必要とされ、免疫原性試験を行うべきである（5. 免疫原性試験 を参照）

#### 4.2 第二のケース（製品がすでに市販されている他の製品と同等と主張し、同等性/同質性を示すことを選択する場合）

この場合は、製造業者は製品が品質、有効性、安全性という点からみて市販の製品と同等であることを示すことになる。この場合、もし申請者が 1) 理化学的性質およびインビトロ活性について詳細に製品の特性解析が可能、2) 同等性については化学的、製剤学的に示すことができる、という 2 点をクリアできるならば、安全性および有効性試験の全てを繰り返す必要はないかもしれない。同等性/同質性評価試験では、すべての試験において同一の標準物質が用いられるべきである。

標準物質が一つ以上の適応症をもつ場合は、必要に応じて、それぞれの適応症について有効性と安全性が示されなければならない。この確認の範囲と程度は、臨床経験、標準物質に関して文献的に得られるデータ、すべての適応症に関して同じ受容体に関与するか否か、前臨床データ、免疫原性試験によって変わる。

安全性データは承認前に必要とされるが、例えば有効性という点で同等性/同質性が示されていても、後になって安全性に差がある可能性が考えられる場合には、市販後にもデータは必要とされるであろう（4.2.4 を参照）。

##### 4.2.1 非臨床データ

製造業者は「バイオテクノロジー応用医薬品の前臨床評価に関するガイドラインノート（CPMP/ICH/302/95）」を考慮に入れるべきである。ポイント全てについて、申請書類中で触れる必要が

あろう。同等性/同質性が検討される場合、本補遺の 3.1.1 と同様の内容が適用される。もし特異的な安全性上の問題（例えば新しい添加剤の使用など）が生じた場合は、新しい製品を臨床試験でヒトに投与する前に、適切な標準的前臨床試験を行い問題点を解決しておくべきである。これらの方法についてはその妥当性を示す必要がある。

##### 4.2.2 免疫原性

免疫原性については、他の手段によって臨床上的関連免疫原性の可能性が除外される場合を除いて、常に臨床データによって検討されている必要がある。もし品質の検討において量的な面あるいは抗原のタイプに差が見出された場合は、さらに検討を行う必要がある（5. 免疫原性試験 を参照のこと）

##### 4.2.3 臨床データ

以下の要件は製品のタイプおよび臨床使用の範囲によって変わる。

一般的には、同等の用量を用いたバイオアベイラビリティ、薬動学的作用に関連する同等性を示す試験が必要とされる。以前に言及したとおり、“equivalence” は前もって定義されていなければならない。薬力学的パラメーターの選択が適格であることが明らかにされている必要がある。

加えて、一般的には、評価される製品と選択された標準物質間で有効性が等しいことを示す臨床試験が必要とされる。試験の種類、エンドポイントの期間とタイプは、経験、製品のタイプ、臨床範囲、代行可能なエンドポイントの有無によってかわる。

すべての同等性試験のデザインに関して、試験の感度の確認が重要である。もしこれがなされていない場合、あるいは適当ではない場合は、他のデザインも検討され、専門家との協議が必要である。

##### 4.2.4 安全性

原理的には、同等性/同質性が示された時、標準物質に関するデータは、新しい製品にあてはめられることになるだろう。しかしながら、バイオテクノロジー応用製品に関する経験の蓄積に従って、有効性は同等であっても、製品が異なる安全性プロファイル（有害事象の性質、重篤度、程度、頻度）を示す場合があることがわかってきている。認可をうける前にこれらの違いを検出するにはデータベースはあまりに小さい。したがって、製品についての安全性プロファイル、およびリスクベネフィットのバランスは、市販後段階においてモニターされる必要がある。

現行の EU の薬剤監視情報ガイドラインに従って、製造販売承認の申請の一部として市販後調査の頻度を軽減するような申請が申請者からされるかもしれない。そのような修正については、同等とされる新製品が認可をうけた場合は、認められないであろう。

さらに、標準物質と安全性プロファイルという点で異なる製品については、PSURs の関連部分で触れ

るべきである。

## 5 免疫原性

### 5.1 免疫原性の予測

バイオテクノロジー由来タンパク質に対して免疫反応を引き起こす因子については、個々のケースについてまでは理解できていない。しかし、一般的には免疫原性は抗原の性質、例えば分子量、溶解性、剤形中のアジュバンド/キャリアーによって影響を受ける。さらに、遺伝型、免疫不全に関係する疾病、交差反応の原因になるかもしれない以前に治療に用いた他のタンパク質への曝露が、免疫原性に関与する可能性がある。投与ルートはホストの免疫反応に影響することがある。静脈内、腹腔内、経口、エアゾール投与などは耐性を招きがちであるが、皮下や皮内投与は強い免疫反応をおこすかもしれない。抗原の繰り返し投与は、一回のみの投与に比べて強い免疫反応を引き起こしがちである。

### 5.2 活性物質および剤形の変化

製造工程の変更により、糖鎖あるいはタンパク質の折りたたみ構造に変化が生じることがある。このような変化は理化学的方法によって常に検出できるとは限らないが、免疫原性の変化の原因になることがある。遺伝子そのものは同一であっても、様々な発現系の間では、翻訳後修飾に違いがあることがある。さらに現象を複雑にする要因としては、同一タンパク質であっても、組織によって糖鎖のパターンが異なるということであり、糖鎖は細胞周期やホルモン状態によっても影響を受ける。さらに治療用タンパク質の抽出、精製などの工程は、タンパク質を変化させ、免疫原性を増強することもある。同様に不純物や賦形剤の質/量の変化によって、免疫原性が変わることもある。このような点に対しては、既に認可された製品と同等であるとして申請された新しい製品においては、特に注意を払わなければならない。凝集による新たなエピトープの出現といった変化が、剤形の変更、貯蔵条件の変更の後に観察されることがある。このような新しいエピトープが患者において免疫反応の原因となることがある。

### 5.3 免疫原性の検討

基本的な要件は、製品に対する抗体価の測定である。抗体価が低い場合、折りたたみ構造、あるいは線状のエピトープに対する抗体も検出可能な十分な感度を有するスクリーニング系を用いる必要がある。このようなアッセイは、既存の製品と同等であるとして申請された製品の同等性/同質性の検証に使用可能である。免疫原性試験を計画するとき、既に考察したような免疫原性を生じさせる因子や、既存の製品について得られている経験を考慮すべきである。抗体を試験するためのサンプリングの周期とタイミングは、抗原のレベルを考慮に入れながら設定し、その妥当性を示すべきである。

もし抗体が検出されたら、抗体の特性を解析するための追加実験と、安全性、有効性、薬理学的パラ

メーターへの影響についての更なる検討が必要になる。一方、個々の患者をモニタリングする際の抗体試験値は、注意深く評価すべきであり、そのことが治療法の決定に影響しうる場合には、日常的な測定とすることが推奨される。

### 5.4 免疫原性の検討はいつ行うか？

同等であると主張した製品の申請時に、特に繰り返し投与が提案された時は、免疫原性の検討は常に行わなければならない。新しいバイオテクノロジー応用製品を開発するときには抗体反応の試験は常に必要なである。既存の製品の製造工程に変更がなされた場合には、ケースバイケースに評価を行うべきである。変更のタイプ、免疫原性に関係する因子、同じかあるいは関連するタンパク質についてのそれまでの使用経験について、考慮すべきである。もしもタンパク質分子が複雑であるために詳細で信頼性における理化学的特性解析が十分にできない場合や、製造工程の変更による免疫原性への影響が否定できない場合は、免疫原性試験は必要である。

基本的には、重要な品質の変化がある場合は、承認前の免疫原性の検討が必要である。免疫原性の発生と誘導の予測は困難であるため、新しいバイオテクノロジー製品が出荷された後、少なくとも一年間は、あらかじめ決められた間隔で、抗体の市販後モニタリングが必要と思われる。

以上のように、欧州では、生物製品の同等性/同質性評価のガイドラインの残された問題としては、1)非臨床試験および臨床試験による有効性、安全性評価の位置付けと方法、2)同等性/同質性を評価する上での免疫原性試験の位置付けと方法、3)先発メーカーによって承認を受けた既存の製品と同等であるとして後発メーカーから申請された製品の同等性/同質性評価の方法、の3点の議論が行われており、2003年3月を目途に、上記のドラフトをもとに、これらの問題を扱ったガイダンスノートが正式に施行される予定である。

### C.5.3 同等性/同質性評価における免疫原性試験に関する欧米の議論

主としてバイオテクノロジー応用製品を中心とした生物製品の製造方法の変更後の同等性/同質性評価法について、欧米で今現在最も議論をよんでいる問題は免疫原性評価の扱いである。

これはタンパク質を医薬品として用いた場合に経験した事故に基づいた懸念であり、遺伝子組換え技術を用いて製造したヒトタンパク質をヒトに投与した場合でも、免疫反応が生じる場合が少なくないという事実に基づいている。その原因としては、同一のアミノ酸一次配列のタンパク質でも、翻訳後修飾を受けて最終産物となる物質の場合など、生産に用いる細胞の違いによって差が生じる可能性が考えられる。また単純タンパク質の場合においても、生産方法の違いによって通常理化学的解析方法では検出が困難な高次構造等に差が生じる場合があること

が想定されている。

欧米でこの種の経験の具体的事例として、製造方法の違いによってインターフェロン $\alpha$ 2a、 $\alpha$ 2b、組換え第8因子等に免疫原性の違いが生じることが報告されている (Schelleken, H., Nature Rev., 1, 457-462, (2002))。しかし、最近の Casadevalle 等による報告事例の場合は、同一起源の組換え EPO について、複数の提携製造業者によって製造された製品間で、免疫原性の違いによると考えられる赤血球減少症が生じた製品があるという報告である

(Casadevalle, N., et al., N. Eng. J. Med., 346, 469-475 (2002))。この症状は特定の製造業者による EPO の投与をうけた慢性腎不全患者の 10,000 人に 1 人の確率で生じたものであるが、同一起源の技術供与を受けて製造された製品でも、他の製造業者の製品では報告されていない。静脈内投与に比べて皮下注射で生じやすいことは明らかになってきたが、発症する患者群と非発症患者群間に違いは見出されていない。赤血球減少症を生じる製品とその他の製品間で原薬を特性解析しても、差は見出されていない。明らかになった差としては、赤血球減少症を生じる製品では、製剤にヒト血清アルブミンが添加されていないこと、および製剤が販売されるまでの貯蔵状態 (特に温度) が厳密にコントロールされていなかった可能性があることである。しかし原因は未だ特定されていない (Bader, FG., in his presentation in the PDA/IABs Conference "Scientific Consideration for Comparability of Biopharmaceuticals" Prague, Feb 27, 2002)。

最近話題になっている原因不明のもうひとつの事例としては、Amgen 社の組換えヒトトロポポエチン (rHuMGDF) があげられる。詳細なデータは公表されていないものの、rHuMGDF では中和抗体は生じないにもかかわらず PEG を結合させた rHuMGDF に対しては中和抗体が生じる場合があり、PEG-rHuMGDF を投与された 435 人の患者のうち 13 人に、汎血球減少症が生じ、この免疫原性を改善できないままに開発中止を余儀なくされたという例が報告された (Wong C, in her presentation in the PDA/IABs Conference "Scientific Consideration for Comparability of Biopharmaceuticals" Prague, Feb 27, 2002)。

これらの例にみられることは、各種の特性解析技術をもってしても物性、構造等に差異が見出せない場合でも、臨床では免疫原性が原因と考えられる有害反応が生じる場合があることである。このような免疫原性の変化は、通常は動物を用いた非臨床免疫原性試験からは予測することができない。ヒト型タンパク質の免疫原性を調べる実験動物モデルとして、被験タンパク質に対する抗体を生成する遺伝子をノックアウトしたトランスジェニック動物を用いた動物モデルによる試験系は、今後の非臨床評価系として有望と考えられるが、現段階ではまだ研究段階にあるにすぎない。

このように、同等性/同質性評価において、構造変化の検出手段としての重要性にとどまらず、安全

性の観点からも免疫原性の変化の検出は極めて重要なポイントと考えられている。しかし現在のところではヒトタンパク質のヒトでの免疫原性を適格に予測する手段は臨床試験以外にはない。さらに製造方法の変更によって生じる免疫原性の違いを原因とする有害事象の頻度は通常極めて低く、臨床試験を行って予測するにも、極めて多くの母集団を用いなければ困難である。したがって、現時点では、画一的な試験を課して予測データを得ようとするより、安全性への観点からの市販後調査を徹底させ、免疫原性の違いによって生じる有害反応が患者にみられる場合は、速やかに検出し、使用上の注意を徹底することが可能なモニタリングシステムを構築することが、現実的な対応としては重要であろう。

#### C.5.4 いわゆる Generic Biologicals の同等性/同質性評価について

先発品と同等/同質であるとして申請された後発バイオテクノロジー応用医薬品等の生物製品の同等性/同質性評価については、議論が様々にある。

米国では 1984 年に発効した医薬品価格および特許期間規正法 Drug Price and Patent Term Restoration Act (ハッチ・ワックスマン法 Hatch-Waxman 法) により、いわゆる Generic Drugs (ゾロ薬) については、略式新薬申請 (安全性、有効性以外の全てのデータは申請に必要であるが、安全性、有効性は文献データで申請可能。ただし標準物質に対する生物学的同等性データが必要) できることが定められ、医薬品資源の有効活用と医療費節約が図られた。しかし 1997 年に発効された公衆衛生法 PHS Act の 351 節において、CBER の規制する生物製品については、安全性、純度、生物活性標準に適合することを製造業者自身が明らかにしなければならなくなり、上記の略式新薬申請は事実上不可能となっている。したがって、米国においては、法律的に略式新薬申請ができる Biologics はない。

一方、欧州においても同様な Generic drugs の略式申請の制度はあるが (65/65 EEC、87/21 EEC 修正)、現在ヨーロッパ議会において Biologics に関する規定の修正案の検討が進んでいる (Directive 2001/83 への補遺 1)。この修正が認められると (2003 年 3 月末までにヨーロッパ委員会で表現が検討され最終案が出される予定)、生物学的に同等な医薬品 ("biosimilar medicinal products" という表現が使われている) の場合、申請には前臨床試験および臨床試験が必要であることが明記されることになる。したがって、欧米においても、法律的に前臨床試験および臨床試験データを必要としない後発品の申請は、生物製品に関してできないことになる。

以上の経過は法律的な問題といえるが、このことは ICH における「生物製品の同等性/同質性評価に関するガイドライン」にも影響を及ぼし、いわゆる後発品は ICH ガイドラインの適用対象から除くことが 2002 年 9 月の ICH 管理委員会で決められた。

しかしながら、科学的な立場からすれば、後発品

の同等性／同質性評価についても、先発メーカーによる同等性／同質性評価と同様の原則で行われるべきであることには変わりない。すなわち、後発品メーカーには、先発品メーカーが開発時に得る詳細な特性解析データはなく、かつ先発品開発時に安全性、有効性を確認するために非臨床試験、臨床試験で用いた標準物質もないので、後発品メーカーは安全性、有効性に関する試験を行わずして安全性、有効性を担保することは実際上できない。したがって後発品メーカーにおいては、必然的に前臨床試験、臨床試験を行わざるを得なくなる。これは非常に大きな製造方法の変更を行い、製品の特性プロファイルに影響がでた場合の先発メーカーの立場と変わりはない。したがって製造方法の異なる生物薬品の同等性／同質性評価の原則には先発メーカーも後発メーカーも変わりはないとみなせる。その証拠として、C.5.2に記した CPMP ガイドラインの補遺における後発品の同等性／同質性に関する考え方も同様のものである。

#### C.5.5 同等性／同質性評価における前臨床試験および臨床試験の位置付け

バイオテクノロジー応用医薬品においては、通常の化学合成医薬品に比べて、製造技術の革新が今現在でも活発になされている。このことを反映して製品の開発段階でも、また認可された後においても、純度、生産効率等を高めることを目的とした製造方法の変更が望まれる場面が少なくない。したがって、製薬企業からの要望においても変更を容易にする審査システムが望まれており、特に欧米ではその傾向が強いようである。製造方法の変更に伴う同等性／同質性評価といえば、当初は安全性、有効性評価試験を繰り返すことなく同等性／同質性を担保するための評価法の検討が目的であった。しかし最近の欧米の議論は、製造方法の変更によって製品の品質に変化が生じた場合に、治療薬としての安全性、有効性に悪影響がないことをどのように評価するか、という方向に目的が変質しているように思われる。このことが、未だ作成していない日本における同等性／同質性評価法ガイドラインを考える上で、欧米との調和に困難をもたらす原因になりつつあるように思われる。

前臨床試験および臨床試験についても、欧米の最近の傾向からすると、同等性／同質性評価において、ブリッジング臨床研究程度は行わなければならない事例を想定して議論を行う傾向になっているように思われる。この点、筆者は、同等性／同質性評価の原点に戻って整理する必要があると考える。即ち、製造方法の変更によって新たな不純物が生じた場合は、その不純物について安全性を確認するための動物実験等は必要であろう。またアミノ酸の一次配列はともかく、高次構造については十分な解析が可能となるような分析手段がないタンパク質性医薬品においては、同等性／同質性を示すためにヒトにおける免疫原性試験、および製剤の生物学的同等性を評価するためのヒトにおける血中動態試験による同等性の

検討が必要な場合も少なくないと思われる。しかし、臨床での有効性についての同等性を評価するための臨床試験を行わなければならないほど、品質に変化が現れた場合には、変更された製造方法で製造された医薬品は同等性／同質性評価の対象とせず、新薬の評価基準に従って評価するという割り切りが必要と考えられる。

#### C.6 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

バイオテクノロジーの進展は、様々なタンパク質を医薬品として設計・製造し、供給することを可能とした。しかし、多くの細胞内タンパク質にみられる糖鎖の付加を人為的に制御することは依然として困難である。糖鎖部分は、生物活性、体内動態、溶解性、及び安定性に寄与しているだけでなく、糖鎖抗原として、安全性にも影響を及ぼすことが知られている。従って、糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、及び品質評価において、最終産物の糖鎖構造を解析することは重要である。また、糖鎖付加は製造法の変更の影響を大きく受けることから、昨今の国際的重要課題の一つである製造方法変更時における同等性／同質性評価において、糖タンパク質の同等性／同質性評価がとりわけ大きな問題となっている。このような背景のもと、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造を簡便・迅速に解析する技術の開発が国際的に望まれている。

我々はこれまで、糖タンパク質の構造解析法として、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法を開発し、糖タンパク質の構造解析に応用してきた。すなわち、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS によって、糖鎖の分布と構造を明らかにし（糖鎖プロファイリング）、酢酸アンモニウム系移動相及び逆相 LC/MS を用いた糖ペプチドマッピングによって、糖鎖結合部位の同定、及び部位特異的糖鎖の不均一性の解析を行ってきた。

本研究は、糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法を糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同等性／同質性評価に応用すること、またその有用性を評価することを目的に行った。昨年度は、起源の異なる3種類の EPO を類似糖タンパク質のモデルとして用い、糖鎖プロファイリング法及び糖ペプチドマッピング法が3種の EPO 間の糖鎖の構造と不均一性の差異を識別できることを確認し、糖タンパク質性医薬品の同等性／同質性評価として有用性であることを示したが、本年度は、糖鎖プロファイリング法、及び糖ペプチドマッピング法の有用性の拡大をめざして、EPO 以外の糖タンパク質への応用、及び分析法の有用性の向上を検討した。モデル糖タンパク質として、国内外で甲状腺癌の診断薬として期待されている遺伝子組換え型甲状腺刺激ホルモン(rTSH)、及びヒト脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモン(pTSH)を用いた(Fig.9)。また、糖鎖プロファイリングにおいて、微量で高分解能スペクトル測定、及び自動 MS/MS 測定が可能な CapLC/ESI-Q/TOFMS を検討した。



## C.6.1 糖鎖プロファイリング

### (1) pTSHの糖鎖プロファイリング

TSH は甲状腺機能を調節している糖タンパク質性ホルモンで、 $\alpha$ 鎖 Asn52, Asn78, 及び $\beta$ 鎖 Asn23 に *N*結合糖鎖が結合している (Fig. 9)。pTSH には非還元末端に硫酸基が結合した糖鎖が付加していることが報告されている。

pTSHから糖鎖を切り出すため、前回EPOから糖鎖を切り出した際と同様の条件下でPNGaseFを作用させたが、糖鎖を遊離させることはできなかった。これはTSHにはジスルフィド結合が多いためと考えられた。そこで、還元カルボキシメチル化してからPNGase Fを作用させることによって、糖鎖を切り出すことに成功した。得られた糖鎖は、グラファイトカーボンカラムによってアノマーが分離されることを避けるために、 $\text{NaBH}_4$ で還元して糖アルコールとして分析した。

昨年度実施したEPO糖鎖のプロファイリングは、セミマイクロLC/MS (内径2.1 mmのカラムを使用) 及びESI-トリプルステージ四重極型MS/MSシステムを用いて行ったが、本年度はCapLC/ESI-Q/TOFMSを検討した。CapLCは内径0.1-0.3mm程度のカラムを用い、流速1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度で目的物質の分離を行うことができるので、微量分析に適しているシステムである。また、ESI-Q/TOFMSはTOFMSによって高分解能スペクトル測定を行うと同時に、自動的にMS/MS測定を行うことができるシステムで、糖鎖の高分解能プロファイリングと自動糖配列解析が可能になることが期待される。我々は、内径0.2mmのグラファイトカーボンカラムを用いたCapLCとESI-Q/TOFMSを組み合わせ、pTSH糖鎖のプロファイリングを行った。

Fig. 10(A)はpTSHから切り出した糖鎖のプロファイルで、複数の糖鎖が付加していることが確認された。昨年度用いたセミマイクロLCでは1回の分析に20 $\mu\text{g}$ ものサンプルが必要であったが、今回は1 $\mu\text{g}$ のサンプルで糖鎖プロファイルを得ることができた。最も大きなピークであるピーク7のマススペクトルをFig. 11(A)に示す。 $m/z$  1028.34のイオンが検出され、同位体ピークとの $m/z$ 値の差が約0.5であることから、2価イオンであることが確認された。また、近傍に1アンモニウム付加体 ( $m/z$  1039.33) 及び2アンモニア付加体 ( $m/z$  1050.32) の2価イオンが検出された。これらの値からピーク7の糖鎖の分子量は2054.68Daと算出された。 $[\text{NeuAc}][\text{Hex}]_4[\text{HexNAc}]\text{-Core}$  (理論分子量: 2054.73 Da; 混成型糖鎖) 及び $\text{SO}_3\text{-}[\text{NeuAc}][\text{Hex}][\text{HexNAc}]_3\text{-Core}$  (理論分子量: 2054.69 Da; 硫酸化複合型糖鎖) が候補として考えられたが、TOFMSによる高分解能スペクトル測定の結果から硫酸化糖鎖と推定された。

ピーク7の詳細な糖鎖構造は自動的に測定されたプロダクトイオンスペクトルから明らかに

なった。まず、 $\text{SO}_3\text{-HexNAc}^+$  ( $m/z$  284),  $\text{HexNAc-HexNAc}^+$  ( $m/z$  407),  $\text{SO}_3\text{-HexNAc-HexNAc}^+$  ( $m/z$  487) 及び  $\text{HexNAc-HexNAc-Hex}^+$  ( $m/z$  596)のイオンが検出されたことから、コアの一方のManに $\text{SO}_3\text{-HexNAc-HexNAc}$ が結合している糖鎖であることが確認された (Fig. 11B)。また、 $\text{NeuAc}^+$  ( $m/z$  292),  $\text{Hex-HexNAc}^+$  ( $m/z$  366),  $\text{NeuAc-Hex}^+$  ( $m/z$  453),  $\text{NeuAc-Hex-HexNAc}^+$  ( $m/z$  657)が検出されたことから、もう一方のManに $\text{NeuAc-Gal-GlcNAc}$ が結合していることが示唆された。以上のことから、ピーク7は硫酸基が結合したモノシアロ複合型2本鎖糖鎖で、Fig. 11Bに示す糖鎖であることが明らかになった。

ピーク7以外のピークは、それぞれのTOFMS分析、及びMS/MS分析から、Table 5に示すように、主に硫酸基が結合した複合型2本鎖糖鎖で、一部混成型糖鎖が含まれることが示唆された。本分析条件において、混成型糖鎖は複合型糖鎖よりも速く溶出されること、また、硫酸化は溶出時間を短縮するが、シアル酸の結合は保持時間を長くさせる傾向があることが明らかとなった。

### (2) rTSHの糖鎖プロファイリング

pTSHと同様な操作によりrTSHから切り出した後還元した糖鎖をグラファイトカーボンカラム-CapLC/ESI-Q/TOFMSで分析した (Fig. 10B)。その結果、rTSHとpTSHは糖鎖分布が異なることが明らかになった。最も大きなピークであるピーク4はpTSHで検出されたピーク7とほぼ同じ時間に溶出された。しかし、マススペクトルから分子量は2224.82と算出され、pTSHのピーク7とは異なる糖鎖で、その組成は $[\text{NeuAc}]_2[\text{Hex}]_2[\text{HexNAc}]_2\text{-Core}$ であることが明らかになった (Fig. 12A)。

ピーク4の詳細構造はMS/MS測定により明らかになった。Fig. 12Bは、ピーク4のプロダクトイオンスペクトルである。pTSHピーク7で検出された $\text{SO}_3\text{-HexNAc}^+$  ( $m/z$  284),  $\text{HexNAc-HexNAc}^+$  ( $m/z$  407),  $\text{SO}_3\text{-HexNAc-HexNAc}^+$  ( $m/z$  487)等のイオンは検出されなかったが、 $\text{NeuAc}^+$  ( $m/z$  292),  $\text{Hex-HexNAc}^+$  ( $m/z$  366),  $\text{NeuAc-Hex-HexNAc}^+$  ( $m/z$  454),  $\text{NeuAc-Hex-HexNAc}^+$  ( $m/z$  657)が検出された。これらのBイオンと、その他一連のYイオンから、ピーク4はCHO細胞産生タンパク質等によく見られるジシアロ複合型2本鎖糖鎖、 $\text{BiNA}_2$  (Fig. 12B)であることが示唆された。

ピーク4以外のピークはTOFMS、及びMS/MSから主にフコース結合または非結合複合型2または3本鎖シアロ糖鎖であることが示唆された (Table 6)。rTSHからはpTSHに認められた硫酸化糖鎖は検出されず、混成型糖鎖の割合も低かった。

以上のように糖鎖プロファイリング法は、pTSH及びrTSHに結合している糖鎖の違いを明

らかにできることを確認した。また、CapLC/ESI-Q/TOFMSは、分析の微量化、高分解能スペクトル測定、及び糖配列分析を可能にすることを確認し、糖鎖プロファイリング法の有用性の向上に役立つことがわかった。

### C.6.2 糖ペプチドマッピング

#### (1) r-TSHの糖ペプチドマッピング

まず、本分析条件による様々な糖ペプチドの分離を確認する目的で、r-TSHをトリプシンで短時間(37℃、4時間)消化して、未消化の糖ペプチドを含む糖ペプチド断片及びペプチド断片とし、ペプチドマッピングを行った。トリプシン消化により予想されるペプチド断片をFig. 9に示す。Fig. 13Aは移動相としてTFAを用いた場合、また、Fig. 13Bは酢酸アンモニウムを用いた場合に得られたペプチド/糖ペプチドマップである。両者は明らかに異なった分離結果を示した。

TFAを用いて得られたペプチドマップ上の各ピークについて、実測値とcDNAから予想されるペプチドの理論値を比較することによって、ピーク1、2、4-7、9-11、及び13-15は翻訳後修飾を受けていないペプチドで、Table 7に示すようなペプチド断片であることが確認された。また、ブロードなピーク、ピーク8、及び12にも、それぞれペプチド $\alpha 8$ 、及び $\beta 8-1$ が含まれていることが明らかになった(Table 7)。

ピーク3、8、及び12はマスペクトルが複雑で、複数のグリコフォームからなる糖ペプチドであることが示唆された(Fig. 14)。単糖の加算によって得られる糖鎖の理論分子量とペプチド部分の理論分子量の和を主なイオンの実測値と照合することによって、ピーク3は糖ペプチド $\alpha 6$ ( $\alpha$ 鎖のAsn52を含む糖ペプチド)、 $\alpha 9$ (Asn78)、及び糖ペプチド $\alpha 9-\alpha 10$ からなるピークと帰属され、2つの糖ペプチドが混在していることが明らかになった。また、ピーク8は糖ペプチド $\alpha 8-\alpha 9$ 及び $\alpha 8-\alpha 10$ ( $\alpha$ 鎖Asn78)であること、ピーク12は糖ペプチド $\beta 3$ ( $\beta$ 鎖のAsn23)であることが確認された。

糖鎖構造については、 $\alpha$ 鎖Asn52及びAsn78にはフコースを含まないシアロ2及び3本鎖糖鎖(BiNA<sub>2</sub>, BiNA<sub>1</sub>, TriNA<sub>3</sub>, TriNA<sub>2</sub>)が、 $\beta$ 鎖Asn23にはフコースを含む2、3及び4本鎖型シアロ糖鎖(FBiNA<sub>2</sub>, FBiNA<sub>1</sub>, FTriNA<sub>3</sub>, FTriNA<sub>2</sub>, FTetraNA<sub>4</sub>)が結合していることが示唆された(Table 8, Table 8に表示したグリコフォームの略語の糖鎖構造はTable 13に記す)。

酢酸アンモニウムを用いた場合は、TFAを用いた場合よりも多くのピークが検出された。マスペクトルから、ピーク1、2、9、10、12-14、及び18-25はTable 9のように帰属された。これらのペプチドはTFA及び酢酸アンモニウムのいずれによっても溶出されたが、その溶出順序は移動相によって異なることが明らかになった。Fig. 13Cは、酢酸アンモニウム系溶離液を用いて得ら

れたピークの中から、分子量の大きい分子( $m/z$  1000-2400)だけを取りだして描いたマスクロマトグラムで、主に糖ペプチドの分布を表している(糖ペプチドマップ)。各ピークのマスペクトルをFig. 15に示す。各イオンの $m/z$ 値から、Fig. 13Cのピークc1-c3, c4-c6, c7-c11及びc12-c14(マスペクトルはそれぞれFig. 15A-C, 15D-F, 15G-K及び15L-N)は、それぞれ糖ペプチド $\alpha 6$ ( $\alpha$ 鎖Asn52)、糖ペプチド $\alpha 9$ と $\alpha 9-\alpha 10$ (Asn78)、糖ペプチド $\beta 3$ ( $\beta$ 鎖Asn23)、及び糖ペプチド $\alpha 8-\alpha 9$ と $\alpha 8-\alpha 10$ ( $\alpha$ 鎖Asn78)であることが明らかになった(Table 10)。

各糖ペプチドに結合する糖鎖の構造はTable 10に示すように推定された。酢酸アンモニウム溶離液を用いて糖ペプチドマッピングを行った場合、TFA溶離液を用いた場合に確認された糖鎖以外の糖鎖の存在が確認された。 $\alpha$ 鎖Asn52にはフコシル2本鎖(FBiNA<sub>2</sub>)、Manを含む混合型糖鎖(Hybrid(4)NA<sub>1</sub>)の付加が示唆された。 $\alpha$ 鎖Asn78にはGlcNAc1分子多いフコシル2本鎖(FBiGN<sub>1</sub>NA<sub>1</sub>)が、また、 $\beta$ 鎖Asn23にはFTetraLac<sub>1</sub>NA<sub>4</sub>, FTetraNA<sub>3</sub>, GlcNAc1分子多いシアル酸結合2本鎖糖鎖(FBiGN<sub>1</sub>NA<sub>3-4</sub>, FBi(1)GN<sub>1</sub>NA<sub>2-3</sub>)、及び分子量の小さい糖鎖(FCoreGN<sub>1</sub>NA<sub>2</sub>)などの付加が確認された。これらは、マイナー成分であるため、TFA移動相を用いた場合は、主イオンの妨害によって検出されなかったが、酢酸アンモニウム移動相を用いた場合は、主成分と分離されたため、検出されたものと思われる。

以上のように、酢酸アンモニウム溶離液を用いると、4つの糖ペプチドグループは完全に分離され、さらに各グループは糖鎖の種類により細かく分離されることが明らかになった。また、これらのピークは、結合しているシアル酸の数の多いものから順に溶出されていることがわかった。以上のように、TFAによる分離は、ペプチド部分に依存し、糖鎖構造の影響を受けないが、酢酸アンモニウムによる分離は、ペプチドのみならず糖鎖構造にも依存することが確認された。

#### (2) rTSHとpTSHの糖ペプチドマップの比較

TSHを完全に消化できる条件(トリプシン消化37℃、8時間)によってrTSH及びpTSHを完全に断片化し、酢酸アンモニウム溶離液を用いたペプチドマッピングを行った。Fig. 16A及びBはそれぞれrTSHのペプチド/糖ペプチドマップ(TICクロマトグラム、 $m/z$  400-2400)、及び糖ペプチドマップ(マスクロマトグラム、 $m/z$  1000-2400)を示し、Fig. 16C及びDはpTSHのペプチド/糖ペプチドマップ、及び糖ペプチドマップを示す。Fig. 16A及び16Cは類似の溶出パターンを示したが、マスペクトル上には相違が認められた。

まず、両者のN末端ペプチド $\alpha 1$ はほぼ同じ位置に溶出されたが、 $m/z$ 値は異なっていた。すな

わち、rTSH由来 $\alpha 1$ の  $m/z$  値は1374.9<sup>3+</sup>、及び2061.9<sup>2+</sup>であったが、pTSH由来 $\alpha 1$ の  $m/z$  値は1281.2<sup>3+</sup>、及び1921.0<sup>2+</sup>であった。これは、rTSHとpTSHのN末端が異なること、すなわち、pTSHではN末端のAPDがプロセッシングされていることを示している (Fig. 9)。

また、rTSHのC末端ペプチドの $\beta 12$ はマススペクトル上  $m/z$  871.6<sup>+</sup>のイオンとして確認することができたが、pTSHのペプチドマップ上では存在を確認できなかった。これはpTSHのペプチド $\beta 12$ がプロセッシングを受けてC末端側の一部アミノ酸を欠損しているため検出されなかったものと考えられる。

さらに、pTSHとrTSHの糖ペプチドマップを比較すると、いずれも $\alpha$ 鎖Asn52、Asn78及び $\beta$ 鎖Asn23の順に溶出されるという点では一致しているが、各ピークを構成しているグリコフォームは全く異なっていることが明らかになった (Table 11, 12)。すなわち、pTSHの $\alpha$ 鎖Asn52には主に複合型と混成型の硫酸化糖鎖、Asn78には複合型の硫酸化及びシアロ糖鎖、また、 $\beta$ 鎖Asn23には複合型のフコシル硫酸化及びシアロ糖鎖が結合していることが明らかになった (Table 12)。尚、結合している糖鎖の種類については、糖鎖プロファイリングで得られた結果とほぼ一致した。

以上のように、酢酸アンモニウム溶離液を用いた糖ペプチドマッピングは、rTSH及びpTSHの一次構造及び部位特異的糖鎖の不均一性の違いを識別できることが明らかになった。

## C.7 多機能性バイオテクノロジー応用医薬品の標準品の設定及び生物学的活性測定法に関する検討

肝細胞増殖因子(HGF)は成熟ラット初代培養肝細胞の増殖を促進する因子として発見された。その後、遺伝子クローニングがなされ、分子量約69kDaの $\alpha$ 鎖と約34kDaの $\beta$ 鎖からなるヘテロダイマーであり、1本鎖の不活性型の前駆体として産生され、その後2本鎖にプロセッシングされることにより活性型の成熟分子となる。その後、受容体であるc-METが発見され、c-METに結合することにより細胞内シグナル伝達系が活性化され、様々な細胞において多彩な生理活性を示すことが次々と明らかになってきている。このような細胞レベルの知見を基に肝疾患を始めとする各種疾患への治療薬としての有効性について疾患モデル動物を用いた検討が精力的になされている。その結果、HGFによるヒトの各種疾患への治療薬としての応用は現実のものとなり、京都大学探索医療センターにおいて劇症肝炎などの患者の肝臓を再生する研究が始められ、5年以内には臨床試験を目指す予定が立てられている。これまでのタンパク性医薬品はある特定の疾患、あるいはそれに関連した疾患の治療薬として用いられていた。しかしながら、HGFの場合、幅広

い生物活性を有することから、全く異なる疾患の治療に用いられることが予想される。今後複数の異なる製薬会社から医薬品としての承認申請がなされた場合、その活性の相互比較はどのように行えばよいか、また、複数の異なる疾患の治療薬として申請された場合、その生物活性はどのような試験に基づいて評価すべきか等、現状では問題点が山積みされている。このような観点からHGFのような多機能性タンパク質に関しては、従来のタンパク性医薬品とは異なる対応が要求されることは明らかである。

そこで本研究においては、最近WHOで行われたHGFの国際標準品の設定の経緯と問題点について検討した。次に各種モデル疾患動物を用いたHGFの治療薬としての有用性に関する現状並びに各疾患の治療効果に関連した細胞レベルの生物学的活性について検討し、今後医薬品申請がなされた場合の適切な生物学的活性試験法を設定するうえでの端緒としたい。

### C.7.1 組換えHGF国際標準品の設定

WHOのNIBSC(National Institute for Biological Standard and Control)によるHGF国際標準品の設定は先に述べたようにHGFの様々な生理作用が明らかになり、各種疾患の治療薬に用いられる可能性が高くなったことに加え、各種疾患の診断マーカー及び予後因子としてHGFの有用性を示す知見が集積されたことによりその必要性が高まったことによる。NIBSCによるHGF国際標準品は、アンプルに充填された二種類の組換えHGF標準品候補を共同検定に加わる各研究室所有の自家標準組換えHGFとバイオアッセイあるいは免疫化学的アッセイにより比較し、その値を決めることで設定することとされた。その際、用いる標準品候補の熱安定性も評価の対象となった。現在1本鎖及び2本鎖の組換えHGFが広く研究に用いられていることから、両者が標準品候補として用いられた。2本鎖組換えHGFとしてはCHO細胞及びマウスミエローマ細胞の一つであるNSO細胞で産生されたもの、1本鎖組換えHGFとしてはバキュロウイルス発現系を用いてsf21細胞で発現させたものが用いられた。これら組換えHGFはその凍結乾燥品を賦形剤含有の緩衝液で溶解後アンプルに充填し、凍結乾燥品として供給された。1アンプル当たりの充填量は1本鎖HGFで4  $\mu$ g、2本鎖HGFで5  $\mu$ gであった。まず、共同検定を行う前にNIBSCにより標準品候補HGFの生物活性に及ぼす賦形剤及び凍結融解、熱による強制分解の影響がHGFの細胞増殖促進作用に基づく二種類のバイオアッセイを用いて検討された。また、1本鎖HGFは不活性型前駆体であり、バイオアッセイ系に含まれる血清により2本鎖の活性型に転換され作用を示すようになる。そこで、ウシ胎児血清(FCS)前処理が1本鎖HGFの2本鎖HGFへの転換に及ぼす作用についても検討された。



まず標準品候補組換えHGFの細胞増殖促進作用を検討した。1本鎖組換えHGFを±20%FCSで前処理し、4MBr5細胞増殖に及ぼす作用について<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みにより測定した結果、1~64ng/mlの範囲で濃度依存的な促進作用がみられ、最大で4倍促進された。なお、50%有効濃度は20%FCS前処理1本鎖組換えHGFで約6ng/ml、未処理では16ng/mlであった。この結果から1本鎖組換えHGFにおいては20%FCSの前処理により2本鎖への転換が促進され、より低濃度で作用を示すことが明らかになった。次に使用直前に溶解した組換えHGF及び溶解後-20℃に保存し2週間後に融解した組換えHGFのMvILu細胞増殖促進作用をTGF-βを添加して増殖を抑制した状態で調べ、凍結融解が及ぼす影響について検討した。なお、本検討にはCHO細胞由来の2本鎖組換えHGFが用いられた。その結果、1~128ng/mlの範囲で濃度依存的に細胞増殖促進作用がみられ、最大で約3倍の促進がみられたが、その濃度依存性および促進の程度は両者で変わらなかった。この結果から、少なくとも1回の凍結融解でHGFは失活しないことが示された。なお、本測定ではクリスタルバイオレットによる核染色が細胞増殖の指標として用いられたが、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みと同様に良好なHGF濃度依存性が示されたことから、その後の共同検定における細胞増殖の測定にはクリスタルバイオレット法が用いられた。同様の細胞増殖アッセイ法により標準品候補組換えHGFの全てについて熱安定性を検討した結果、室温から37℃の範囲で4~5ヶ月保存した組換えHGFの細胞増殖促進活性は-20℃で同様の期間保存したものと変わらなかった。従って、凍結乾燥品において標準品候補組換えHGFは用いた条件においては安定であることが示された。なお、賦形剤の影響はみられなかった。

以上の基礎的検討結果から、標準品候補組換えHGFが共同検定を行う標品として妥当であることが示されたことから、次に標準品候補組換えHGFの生物学的活性及び免疫学的活性について11の施設で共同検定が行われた。生物学的活性については細胞を用いたバイオアッセイを用いて評価され、用いる方法の選択については各施設に委ねられた。結果的に用いられたバイオアッセイ法は、MDCK上皮細胞の遊走、BaF3細胞増殖(<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み)、同細胞におけるc-Metのチロシンリン酸化、MvILu細胞の増殖(クリスタルバイオレット法、<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み)、初代培養ラット肝細胞の増殖(<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み)、及び乳腺上皮細胞B5/589細胞の増殖(<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み)であった。これらの方法を用いて、各標準品候補組換えHGFの含量を各施設が所有する濃度既知の自家組換えHGF標準品と比較した。その結果、ほとんどの場合、互いに平行な用量反応直線が濃度を対数に変換した場合において得られたが、1施設では自家標

準品が作用を示さず、1施設では標準品候補組換えHGFが平行な用量反応性を示さなかった。そこでこれら2施設のデータを除き、その他の施設における検討結果がまとめられた。作成した1アンプル当たりの標準品候補組換えHGF充填量はCHO細胞由来で5μg、sf 21細胞由来で4μg、マウスミエローマ細胞由来で5μgであったが、全体の検討結果からCHO細胞由来で4.03μg(変動係数233%)、sf 21細胞由来で1.70μg(変動係数199%)、マウスミエローマ細胞由来で4.89μg(変動係数267%)と含量が算出された。なお各施設における値の再現性は良好であった。各施設の自家標準品は1本鎖あるいは2本鎖の組換えHGFであるが、1本鎖及び2本鎖標準品候補組換えHGFの含量及び変動係数を、それぞれ1本鎖及び2本鎖自家標準品組換えHGFの値を元に算出し直しても、その値は先の全体の自家標準品を元にした値とさほど変化はみられなかった。また、算出された各標準品候補の含量をお互いの相対比で取り直すと変動係数は44%以下に低下した。標準品候補組換えHGFの中で、充填量に比べ特に測定結果から算出された含量が低かったのはsf 21細胞由来のもので、その値は約40%であった。先の予備的検討により、1本鎖HGFから生物活性を有する2本鎖への変換はFCS濃度に依存することが明らかになっていることから、用いられたバイオアッセイではFCS濃度が低いためこの変換が充分ではなく、含量が低く算出された可能性が考えられる。変動係数が全体的に極めて高い理由については、各施設における自家標準品と標準品候補の比活性が互いに異なっていることが主な原因と考えられる。その違いは由来及び調製法の違い、保存時における失活の可能性が考えられる。実際、充填量に比べて約4倍高い含量が得られたある施設では、4℃における長期保存による自家標準品の失活の可能性を指摘している。

標準品候補組換えHGFの免疫学的活性については、市販あるいは各施設で確立されたELISA系を用い、自家組換えHGF標準品を基にした測定が行われた。全体の結果より、CHO細胞由来で3.86μg(変動係数51%)、sf 21細胞由来で2.11μg(変動係数147%)、マウスミエローマ細胞由来で3.71μg(変動係数71%)と含量が算出された。なお各施設における値の再現性は良好であった。各施設で測定に用いられた抗体の特異性については明らかではないが、全体的に2本鎖HGFの値は1本鎖HGFに比べ2倍高い値が得られた。これは恐らく1本鎖に比べ2本鎖HGFのほうが抗体に認識されやすいことによると思われる。また、1本鎖組換えHGFは昆虫細胞であるsf 21細胞で産生されるが、本細胞においては哺乳類細胞でみられるガラクトースとシアル酸を含む複合型糖鎖は形成されないことから、HGFの抗体による認識は形成される糖鎖の違いにより異なる可能性が考えられる。また、1本鎖と

2本鎖では形成されるHGFの立体構造も異なる可能性も考えられることから、立体構造の違いにより抗体による認識が異なる可能性も考えられる。また、自家標準品として2本鎖組換えHGFにおける値を基に2本鎖標準品候補組換えHGFの値を算出し直すと、CHO細胞由来で3.81  $\mu\text{g}$  (変動係数60%)、マウスミエローマ細胞由来で2.97  $\mu\text{g}$  (変動係数54%)であった。同様に、自家標準品として1本鎖組換えHGFにおける値を基に1本鎖標準品候補組換えHGFの値を算出し直すと、sf 21細胞由来で4.86  $\mu\text{g}$  (変動係数5%)であった。以上のように、同様な型の組換えHGFで全体の結果を算出し直すと、標準品候補であるCHO及びsf 21細胞由来組換えHGFの含量はそれぞれの充填量である4  $\mu\text{g}$ 及び5  $\mu\text{g}$ とよく一致し、変動係数も比較的lowであった。

以上の検討結果から、WHO生物学的物質標準化の専門家の会議において、CHO細胞由来のHGFを組換えHGF 1次国際標準品とし、1アンプル当たり生物学的な力価として4000IU、免疫学的な値として4  $\mu\text{g}$ と設定された。また、同様に1本鎖のHGFに関してはsf 21細胞由来の組換えHGFを1次国際標準品とし、1アンプル当たり2000IU及び4  $\mu\text{g}$ と設定された。

### C.7.2 疾患モデル動物を用いた組換えHGFの各種疾患の治療効果と治療効果に関連した細胞レベルにおける作用

肝臓における劇症肝炎、急性肝炎、肝硬変、肝繊維症、脂肪肝などに対してHGFが治療薬として有用である可能性が各種肝炎疾患モデル動物を用いた検討から明らかにされている。劇症肝炎、急性肝炎に対するHGFの治療効果については抗アポトーシス、肝細胞の増殖促進、抗肝炎作用、胆管の形態形成誘導、タンパク質(血液凝固・線溶系関連タンパク質、アルブミン等)の合成促進作用によることが示されている。肝硬変、肝繊維症に対するHGFの治療効果については細胞外マトリックスの融解、抗アポトーシス、肝細胞の増殖促進、TGF- $\beta$ の発現抑制、タンパク質(血液凝固・線溶系関連タンパク質、アルブミン等)の合成促進作用によることが示されている。脂肪肝に対する治療効果については脂質の分泌促進によることが示されている。肝移植、部分肝切除、肝虚血、肝臓などの外科的手術に関するHGFの治療効果については抗アポトーシス、肝細胞の増殖促進、タンパク質(血液凝固・線溶系関連タンパク質、アルブミン等)の合成促進、肝臓細胞の増殖抑制作用によることが示されている。

これら治療効果と関連した細胞レベルにおけるHGFの作用については以下のような知見が得られている。初代培養ラット肝細胞において、HGFは1~10ng/mlで濃度依存的にDNA合成を促進し、最大で10倍以上の促進がみられる。HGFは初代培養ラット肝細胞において、アルブミン合成及び分泌を同様な濃度依存性で約1.5倍促進す

る。初代培養ラット肝細胞において、HGFはグルコース6リン酸脱水素酵素の活性を同様な濃度依存性で約2倍上昇させる。初代培養マウス肝細胞において、HGFはインターフェロン $\gamma$ によるLDHの遊離を0.1~10  $\mu\text{g/ml}$ で濃度依存的に抑制し、最大で約50%の抑制がみられる。肝臓細胞の一つであるHepG2細胞においてHGFは50ng/mlで約64倍アポトーシスを誘導することがTUNEL法を用いた測定により明らかになっている。また、同細胞においてDNA合成を約30%抑制することが知られている。なお、これら作用の濃度依存性については不明である。形質転換したラット肝上皮細胞AFLB8及びC4Tにおいて、HGFは増殖を10ng/mlでそれぞれ約50%及び70%抑制することが知られている。また、AFLB8においてHGFは10ng/mlでアポトーシスを約5倍促進することが知られている。なお、これら作用の濃度依存性については不明である。

腎臓において急性腎不全及び慢性腎不全に対してHGFが治療薬として有用である可能性については、急性及び慢性腎不全モデル動物においてHGFが腎臓機能低下による血中尿酸窒素及び血清クレアチンの上昇を強く抑制することから明らかになっている。これら治療効果はHGFによる尿細管上皮の増殖促進、尿細管再構築、抗アポトーシス作用、コラゲナーゼの活性化、TGF- $\beta$ の発現抑制などによることが知られている。

これら治療効果と関連した細胞レベルにおけるHGFの作用については以下のような知見が得られている。腎臓近位細管細胞の一つであるPT-1細胞において、HGFは0.01~100nMで濃度依存的に増殖を促進し、最大で約6倍の促進がみられる。この結果は培地に10%FCS添加した場合であるが、同じ細胞の無血清培養において、HGFは1nMで増殖、遊走、管腔形成を約2倍、微繊毛の形成を約1.5倍促進するという報告もある。なお、これら作用の濃度依存性については不明である。牛尿細管上皮(MDCK)細胞のコラーゲンゲルにおける培養において、全体に占める管腔構造を形成したコロニーの割合をHGFは2~40ng/mlで濃度依存的に増加し、最大で約80%の増加がみられる。腎糸球体細胞におけるシクロスポリンA処理によるアポトーシスの誘導に対して、HGFは50ng/ml及び100ng/mlでそれぞれ約50%及び100%阻害する。なおアポトーシスの測定は、ヒストンに結合したDNA断片の細胞質への遊離を元にした市販のELISAキットを用いて行われている。腎臓細管上皮細胞の一つであるmIMCD-3細胞において、90%ATP除去による接着抑制に対してHGFは40ng/mlでコントロールレベルまで回復させる。ヒト近位尿管細胞の一つであるHKCで、HGFは20ng/mlで血清除去による生存細胞数の低下を約2倍抑制する。なお、これら作用の濃度依存性については不明である。ヒト腎臓動脈内皮細胞において、腎臓障害への関与が知られているエンドセリン-1の遊離をHGFは0.001

～10nMで濃度依存的に抑制し、最大で約75%の抑制を示すことが知られている。

心筋梗塞、慢性動脈閉塞症などの血管機能障害に対してHGFが治療薬として有用である可能性が各種血管機能障害モデル動物を用いた検討結果から明らかにされている。これらの治療効果は、血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成、MT1-MMP産生、VEGF産生、MMP-2活性化Flk-1 (VEGFのレセプター) 発現などの促進及び抗アポトーシス作用によることが明らかになっている。

ヒトさい帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)において、HGFは1～10ng/mlの範囲で濃度依存的に増殖を促進し、最大で約2倍促進させる。また、同細胞でHGFは1～50ng/mlの範囲で濃度依存的に遊走を促進し、最大で約1.2倍促進させる。HUVECにおけるHGFの遊走及び増殖促進作用については、作用の程度は若干異なるものの多数報告されている。また、ヒト大静脈由来血管内皮細胞において、HGFは1～100ng/mlの範囲で濃度依存的にDNA合成を促進し、最大で約10倍促進させる。ヒト大静脈由来内皮細胞において、HGFは1～100ng/mlの範囲で濃度依存的に血清除去による細胞数の低下を抑制し、最大で約30%抑制する。同細胞においてHGFは100ng/mlで血清除去によるアポトーシス及びネクローシスの誘導を約40%抑制する。また、同様な実験系でHGFは10ng/mlでアポトーシスの誘導を約80%抑制するという報告もある。ヒト大静脈由来内皮細胞におけるアポトーシス及びネクローシスの誘導は高濃度のD-グルコースによっても誘導されるが、HGFは100ng/mlでその誘導をほぼ完全に抑制する。なおこれら抑制作用の濃度依存性については不明である。正常ヒト内皮細胞の一つであるHMVEC及びHCAECにおいて、HGFは2～10ng/mlの範囲でMT-1MMPタンパク質を6～9倍増加させる。同様の細胞においてHGFは2ng/mlでMMP-2の活性化を約3～4倍促進する。なお、その濃度依存性については不明である。HUVECにおいてHGFは1～50ng/mlの範囲で濃度依存的に遊走を促進し、最大で約2.5倍促進する。ヒト表皮細胞A431及びヒト角化細胞HaCaTにおいてHGFは1～100ng/mlの範囲で濃度依存的に培養上清におけるVEGFの蓄積を促進し、最大で約4倍促進する。同様の作用はヒト初代角化細胞でも知られているが、その最大促進効果は約2.5倍である。また、HGFは20ng/mlでHUVECにおけるVEGF受容体であるflk-1の発現を約2倍増加させることがFACSを用いた解析から明らかになっている。なおその濃度依存性については不明である。

## C.8 安定性試験における品質確保基準に関する研究

日米欧3極内において新有効成分含有医薬品の原薬及び製剤の承認申請を行うときに必要な安定性試験成績を得るための標準的な試験方法は、「新原薬及

び新製剤の安定性試験」に関するICHガイドラインに記載されている。しかし、それに従って得られた安定性データをどのように利用してリテスト期間又は有効期間を提示したらよいかについては統一した方法が確立されていない。また、どの程度まで長期保存条件での実測期間を超えた原薬のリテスト期間又は製剤の有効期間を提示することができるかに関しての考え方も各極間で異なっている。したがって、医薬品承認申請のグローバル化のためには、安定性試験データの評価法に関する国際調和が必要になっている。

安定性試験は、3ロット以上の原薬又は製剤について行う試験に基づいて、将来にわたって同じ状況で製造、包装される全てのロットに適用できるリテスト期間又は有効期間、さらに貯蔵方法のラベル表示を設定するために行われる試験であり、試験で得られたデータの評価が試験の最も重要な部分といえる。本研究では、安定性試験の目的が適切に達成されるような安定性試験データ評価法の確立を目指し、国際調和のための基礎的検討を行った。

### C.8.1 回帰曲線の傾きおよび切片の差の共分散分析に基づく一括評価の検定

含量や容器サイズあるいは容れ目などの要因が単一の原薬および製剤について、異なるロットに由来するデータを一括し、すべての原薬あるいは製剤に適用できる単一の有効期間を推定できるか否かを判断する方法として、共分散分析による方法がある。

すなわち、異なるロット由来のデータを一括する前に、予備的な統計的検定を実施して、時間を共変量とみなす共分散分析によってロット間の回帰直線の傾きおよび縦軸切片の差を検定し、異なるロットの回帰直線の傾きと時間ゼロ時の縦軸切片が共通であるかどうかを判断する。正式な安定性試験では検体サイズが比較的小さく、検出力が低いことが予想されるので、それを補償するために、有意水準は0.25として各検定を行う。

傾きが等しいとする仮説が検定で棄却された場合、すなわち、ロット間に傾きの有意差が存在する場合には、全ロットのデータを一括することは不適切とみなされる。この場合、個々のロットのリテスト期間又は有効期間は、個々の縦軸切片及び個々の傾き、並びにすべてのデータから計算した平均二乗誤差を用いて推定することができる。全ロットのリテスト期間又は有効期間として、個々のロットの推定値のうち最も短いものを選ぶ。

縦軸切片が等しいとする仮説が検定で棄却されるが、傾きが等しいことを棄却できない場合、すなわち、ロット間で縦軸切片には有意差があるが、傾きには有意差がない場合には、データを一括して共通の傾きを求めることができる。この場合、個々のロットに対するリテスト期間又は有効期間は、共通の傾き及び個々の縦軸切片を用いて推定し、個々のロットの推定値のうち最も短いものを全ロットのリテスト期間又は有効期間として選ぶ。

傾きが等しいとする仮説および縦軸切片が等しい

とする仮説が有意水準 0.25 で棄却されない場合、すなわち、ロット間で傾きおよび縦軸切片に有意差がない場合には、全ロットのデータを一括したデータから単一のリテスト期間/有効期間を推定し、それを全ロットに適用できる。ロットを一括することによってデータ量が増加するにしたがって回帰直線の信頼限界幅が狭くなるので、通常、一括したデータから推定したリテスト期間/有効期間は個々のロットから求めたものよりも長くなる。この一括評価に関する検定は、まず傾きの項を検定し、次に縦軸切片の項を検定して、項の数を最小にしたモデルにしたがってリテスト期間/有効期間を設定する。

複数の要因がある製剤の場合には、異なる要因のデータを一括し、すべての製剤に適用できる単一の有効期間を推定できるか否かを共分散分析によって判断する。すなわち、共分散分析によって、要因及び要因の組み合わせ間の回帰直線の傾きと縦軸切片の差を検定する。

全ての主効果及び交互作用の縦軸切片及び傾きの項、及び測定ランダム誤差を反映する項が含まれた統計的モデルを使う。高次の交互作用が極めて小さいと考えられる場合には、モデルにその項を含める必要はない。

通常、まず傾きの項を検定し、次に、縦軸切片の項を検定する。また交互作用は主効果よりも前に検定する。すなわち、高次交互作用の傾きの項から検定を開始し、次に高次交互作用の縦軸切片の項を検定し、さらに主効果の傾きの項、そして主効果の縦軸切片の項という順番で検定する。統計的に有意であることが明らかな項のみからなるモデルを利用して、有効期間を推定する。

検定に用いる有意水準としては、ロットが関わる項には 0.25、ロットが関わらない項には 0.05 を用いる。異なる要因の組み合わせから求めたデータを一括評価できることが示された場合には、一括したデータを用いて有効期間を推定できる。

一括評価に関する検定によって特定の要因又は要因の組み合わせから得たデータを一括すべきではないと示された場合には、有意差があると判断された要因及び要因の組み合わせのそれぞれについて、別々の有効期間を推定するか、または、最も短い有効期間の推定値を単一の有効期間とすることができる。

### C.8.2 推定値のレンジに基づく一括評価の検定

上記の共分散分析による一括評価の検定のように回帰曲線の傾きと切片の変動を検定するのではなく、個々のロットや要因で得られる有効期間の推定値についてその同等性を推定値のレンジに基づいて検定し、異なるロットや要因に由来するデータを一括し、すべての製剤に適用できる単一の有効期間を推定できるか否かを判断することもできる。この方法では、例えば含量違いの製剤について推定した有効期間にある一定の割合の差が認められたとき、有意な差があるとみなす。

### C.8.3 各要因のリテスト期間/有効期間の推定値と設定値との比較に基づく評価（一括評価に関する検定を行わない方法）

含量や容器サイズあるいは容れ目などの要因が単一の原因および製剤について、異なるロットに由来するデータを一括できるかどうかを判断するための一括評価に関する検定を行わずに有効期間を決める方法として、ロットの中に、提示したリテスト期間又は有効期間より短いリテスト期間又は有効期間を持つものがあるか否かを評価する方法がある。

まず、個々のロットのリテスト期間又は有効期間を、個々の縦軸切片、個々の傾き及びすべてのデータから計算した平均二乗誤差を用いて推定する。各ロットのリテスト期間又は有効期間の推定値が提示したもののより長い場合には、提示したリテスト期間又は有効期間は適切であると考えられる。

しかし、1つ、又は複数のリテスト期間又は有効期間の推定値が提示した期間より短い場合は、一括評価に関する検定を実施して、ロットを一括できるか否かを判断できる。

また、この方法は、一括評価に関する検定のプロセスで使うこともできる。ロットの回帰直線が共通の傾きを持ち、共通の傾きと個々の縦軸切片に基づいて推定した有効期間が提示した有効期間よりも長い場合には、一括評価が可能であるか否かについて縦軸切片の検定を継続する必要はない。

複数の要因がある製剤の場合には、異なる要因のデータを一括できるかどうかを判断するための一括評価に関する検定を行わずに、要因の組み合わせの中に、提示した有効期間より短い有効期間を持つものがあるか否かを判断して有効期間を決める。

共分散分析による一括評価と同様に、まず、ロットや含量などの要因で有意差があるとする統計的モデルにしたがって、各要因及び要因の組み合わせのそれぞれについて有効期間を推定する。全ての有効期間の推定値が提示した有効期間より長い場合は、提示した有効期間は適切であると考えられる。有効期間の推定値のうち提示した有効期間より短いものがある場合は、各要因について共分散分析を行っていき、その都度、新しいモデルにしたがって、各要因及び要因の組み合わせのそれぞれについて有効期間を推定する。全ての有効期間が提示するものより長い場合には、それ以上のモデルは必要でない。

### C.9 医薬品の品質管理における Process Analytical Technology (PAT) の活用に関して

本研究では、米国 FDA が現在推し進めつつある Process Analytical Technology (PAT) を活用した医薬品の品質管理戦略に着目して、医薬品の品質管理における PAT 活用の意義を明らかにするとともに、欧米の製薬企業が PAT をどのように活用しようとしているか、また、我が国において PAT に関してどのような研究がなされているかを紹介し、これらを踏まえて我が国における PAT 活用の方向性について考察した。

### C.9.1 PAT とは？

Process Analytical Technology (PAT) は、日本語には「工程分析技術」と訳されることが多いが、この訳語は直訳的であり、PAT の本来の意味合いが伝わるものとはなっていない。

PAT の定義としては、「製造プロセスの進行中における原料や中間体の重要な品質パラメーターおよび品質に影響する機能特性のタイムリーな測定と管理のシステム、ならびにプロセスの終了時点において最終製品が受け入れ可能な品質を有することを保証するプロセス」が提案されている<sup>43)</sup>。このように、PAT は“医薬品製造における工程分析の科学的手法、工程管理と制御のフィードバックの方法、情報管理ツール、製品の品質や工程の最適化の方法”などの技術を、製造プロセスを持続的に検証し、品質保証の基盤を提供するのに最善の形で応用しようとする戦略的な狙いをもつものである。

分かりやすく言えば、PAT はコンピュータ技術を含む最近の科学技術の目覚ましい発展によって製造プロセスの進行中にいろいろな分析手段（例えば、近赤外吸収スペクトル測定法）を活用して種々の特性をリアルタイム（あるいはそれに近い形）で測定ができるようになってきたことから製造プロセスを解析、モニターするのに用いられ始めた分析技術をベースとした品質保証の方法論であり、種々の分析手段を活用して製造プロセスを解析することによって、これまで必ずしも十分に解析が行われず、ブラックボックスに近い状態にあることも多かった医薬品の製造プロセスにおいて何が起きているか、医薬品の品質を担保する上で種々の変動要因のうちどれがキーとなる要因であるか、その要因をどのようにコントロールすればよいかを明らかにするとともに、こうした解析結果を製造工程にフィードバックしてその改善に役立てることやその要因をリアルタイムでモニターして品質担保の指標にすることを目的とするものである。

### C.9.2 FDA による PAT 推進の背景

FDA が PAT を推し進めつつある背景には、①医薬品産業は化学工業など他の産業に比べて、また、米国の医薬品産業は欧州の医薬品産業に比べて、PAT に代表される技術革新、新技術の導入が遅れている、②このことは米国における規制のハードルの高さを反映しており、医薬品産業が柔軟に対応するのが難しくしている結果、FDA に大きな負担として跳ね返っている、③この状況を改善するためのベースとして PAT が活用できるとの認識があると考えられる<sup>42)</sup>。

FDA は、新薬申請と承認後変更の審査と承認、ならびに既承認医薬品の GMP 査察に追われているが、医薬品の製造に由来する問題は増加する傾向にあり、FDA に大きな負荷がかかっている状況にある。その原因としては、製造システムが旧来からの考えに基づくもので、技術革新、新技術の導入に遅れをとっていること、製造プロセスの質が経験的なもので科学的な基準に立脚したものとなっていない（ICH の

合意事項も 1990 年代の技術をベースにしている）こと、規制のハードルが高いため、製薬企業が規制も係わるようなリスクを取えとろうとしない（技術革新に基づいた品質保証の新しいコンセプトを提起しようとする）ことなどが挙げられる。

この状況を打開するため、FDA / CDER（医薬品評価センター）の Woodcock 部長は、次の 4 点を FDA の挑戦課題として挙げている<sup>43)</sup>：

- ①如何にして高い品質を確保しつつ、技術革新を行うよう奨励していくか、
- ②如何にして製造プロセスの質を経験的なものから科学的な基準に立脚したものにシフトさせていくか、
- ③如何にして承認前の審査への依存を減らすか、
- ④如何にして新技術の導入のために必要な科学的戦力を確保、訓練していくか。

2002 年 8 月、FDA は、「21 世紀の医薬品 cGMP リスクに着目したアプローチ（Risk-based Approach）」を公表し<sup>44)</sup>、次のような方針を示している：

- 1) 既存システムに対して統合的な品質システム（Integrated Quality System）とリスクマネジメントのアプローチを求め、近代的で革新的な製造技術の採用を奨励する。
- 2) 承認前の審査と cGMP プログラムを統合し、より一貫性のあるアプローチを行う。
- 3) 限られたリソースの有効活用を行う。すなわち、優れた科学的思考と分析技術を駆使して、予測可能で特定可能な健康危害に関連する重要な品質の問題への取り組みに力を注ぐ。

上記の下線部分は PAT の活用を念頭に置いたものと考えられる。このように、PAT は FDA の目指す「21 世紀の医薬品 cGMP」の展開の柱の一つとなっているものと言えよう。

### C.9.3 PAT で用いられる分析技術と欧米における活用の事例

PAT で用いられる分析技術としては、近赤外吸収スペクトル測定法（NIR）やラマンスペクトル測定法などの分光分析法、音響ならびに電子音響分析法（分散体、エマルションなどの特性解析）、X 線分光分析法、電気化学分析法（pH、伝導率、電位差、誘電率などの測定）、クロマトグラフィー（LC、GC、容積移動クロマトグラフィーなど）、センサー技術、ケモメトリクスなどが挙げられている。インラインの測定が可能のように、これの分析機器を医薬品製造用の装置に組み込んだもの（例えば、Fig.17 の装置）も開発されている。

欧米における PAT の活用例として、2002 年 2 月に開催された FDA の PAT Subcommittee meeting では次のような事例が挙げられている<sup>45)</sup>：

- ①ビン型混合機（Bin blender）における NIR を用いたインライン測定に基づく混合均一性の評価



- ②乾燥機における NIR を用いたインライン測定に基づく水分含量の評価
- ③NIR を用いた錠剤の成分含量の評価
- ④晶析機における反射型ビーム測定による結晶の粒子径・粒度の評価
- ⑤粉末混合におけるイメージング分光を用いた混合均一性の評価
- ⑥攪拌造粒における音響分析法を用いた造粒プロセスの解析

このうちから①のピン型混合機 (Bin blender) における NIR を用いたオンライン測定に基づく混合均一性の評価を以下に紹介する<sup>46)</sup>。これはファイザー製薬の Dr. Hammond が報告した同社における PAT の活用研究の一部で、同社が開発した On-line NIR bin blender (Fig.17) が用いられている。

Fig18 に、この On-line NIR bin blender の Corona Sensor Head の断面図を示した。窓板を通して近赤外光をサンプルに照射し、サンプルからの散乱光を Fibre Optic Collector に集め、分光して NIR スペクトルを測定することにより、Blending の際の各成分の混合状態をオンラインで観測することができる。窓の大きさは 300mg ほどのサンプルの状態が観測できる 30mm とされている。あまり小さな窓では、少量のサンプルの状態しか観測できず、混合状態を正しく判断できないおそれがあるためである。

Fig.19 は、アピセル、ラクトースおよびサッカリンを Blend したとき (ステップ 1) の混合の進み具合を観測したものである。Fig.19 左図のように、アピセルとラクトースは 1600~1635nm の領域に吸収を示さないのに対して、サッカリンは 1620~1630nm に吸収を示す。このため、アピセルやラクトースにサッカリンを Blend するときには、この吸収の変化を観測することにより、混合の進行状態を把握することができる。

Fig.19 右図は、サッカリンを窓板から離れたところに加えて Blender を運転したときの 1600~1635nm 領域のスペクトル変化を示したものである。運転直後には、窓板の近くにはサッカリンが存在せず、吸収はほとんど認められないのが、混合が進むに従って 1620~1630nm の吸収の強度が増加して、ほぼ一定の強度に達している (全体が均一な混合状態になったことを示す) 様子が分かる。

Fig.20 は、こうしてできたアピセル、ラクトースおよびサッカリンの混合物にさらに滑沢剤のステアリン酸マグネシウムを Blend したとき (ステップ 2) の混合の進み具合を観測したものである。Fig.20 左図に示したように、1370~1410nm の領域では、ステアリン酸マグネシウムは 1390nm 付近にアピセル、ラクトース、サッカリンに比べて強い吸収を示すことから、アピセル、ラクトースおよびサッカリンの混合物にステアリン酸マグネシウムを Blend するときには、この吸収の変化を観測することにより、混合の進行状態を把握することができる。

Fig.20 右図は、ステアリン酸マグネシウムを

Fig.19 の場合とは逆に窓板に近いところに加えて Blender を運転したときの 1370~1410nm 領域のスペクトル変化を示したものである。運転直後には、窓板の近くにステアリン酸マグネシウムが偏在するために認められていた 1390nm 付近の吸収の強度が混合が進むに従って弱くなり、ついにはほとんど認められない状態に達している (量的に少ないステアリン酸マグネシウムが全体に分散して均一な混合状態になったことを示す) 様子が分かる。

Fig.21 は、ステップ 1 の Blending におけるアピセル、ラクトースおよびサッカリンの吸収強度が Blending 時間とともに変化する様子を示したものである。

また、Fig.22 は、ステップ 1 の Blending の際の各時点での 1630nm のサッカリンによる吸収の強度を基に隣接 8 時点全体での吸収強度のばらつきの大きさを求めて、Blending 時間に対してプロットしたものである。得られたプロットから、12 番目の時点ではばらつきが極大に達し、その後は減少して、24 番目以降の時点ではほぼ一定となることが分かる。すなわち、少なくとも 24 番目の時点まで Blending を行えば、サッカリンの混合均一性は担保されることが分かる。

ステップ 2 の Blending の際のステアリン酸マグネシウムについても Fig.22 と同様の検討により、どの時点まで Blending を行えば、ステアリン酸マグネシウムの混合均一性が担保されることが明らかにされている。

Dr. Hammond は、この On-line blending の利点を次の 8 点にまとめている。

- ①試料と直接接触しないので、試験者の安全性が担保できる。
- ②測定の際に試料をサンプリングする必要がないので、サンプリングに起因するエラーが生じない。
- ③リアルタイムの情報が得られる。
- ④多成分について同時に混合の均一性を検討できる。
- ⑤プロセスへの理解を深められる。
- ⑥プロセスの特性をきちんと把握することにより、その情報をスケールアップの際にも活用することができる。
- ⑦プロセスへの深い理解をベースに据えることにより、品質の良いものを生産開始の当初から製造することができる (Right first time)。
- ⑧混合工程から次の工程への物の流れが速やかとなり、混合に要する時間を短縮できる。

#### C.9.4 我が国における PAT に関する研究の紹介

本研究の研究協力者である大阪府立大学寺下助教による複合型造粒機の造粒機構を解析し、含量均一性に優れた造粒物を調製できる操作条件を明らかにした研究(栗本一平、寺下敬次郎、宮南啓、主薬賦形剤の含量および粉体物性にに基づく複合型造粒機の造粒過程、第 16 回製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集平成 11 年 10 月 21 日)を以下に紹介する。

医薬品の固形製剤化で注目されている複合型造粒機の造粒過程および造粒機構を明らかにすることは、含量均一性に加えて、品質管理された造粒物を製造する合理的な操作条件を決定するために極めて重要である。造粒機構が把握できれば、造粒プロセスのバリデーションが容易になるだけでなく、GMPに対する信頼性も高まる。

本研究では、溶解性の異なるモデル薬物を採用し、造粒物の含量測定および造粒物の物性に基づいて複合型造粒機の造粒機構を解析した。さらに、主薬および賦形剤の含量均一性に優れた造粒物を調製できる操作条件（乾燥時間）を明らかにした。

### (1) 試料粉体と処方

造粒実験に採用した試料粉体とその処方を Table 14 に示す。難溶性のモデル薬物にはプロベネシドを、また、溶解性の良いモデル薬物にはアスコルビン酸を用いた。これらの薬物を用いた処方を、以後プロベネシド系ならびにアスコルビン酸系と呼ぶ。

### (2) 実験装置および実験操作

造粒実験には、複合型造粒機（マルチプレックス MP-01 型、パウレック社製）を用いた。また、造粒物の主薬と賦形剤の含量測定には、回折格子型近赤外吸収分光装置（NIR）（インフラ・ライザー500 型、プラン・ルーベ社製）を用いた。まず、主薬および賦形剤の付着・凝集過程を明らかにするために、造粒開始後、一定時間ごとに造粒操作を停止し、造粒物を全て取り出して、水分値が1~2%になるように乾燥温度 60℃で棚式通風乾燥して、含量と造粒時間および乾燥時間との関係を調べた。また、乾燥過程における造粒物の粉化状態を検討するため、結合剤溶液を所定量噴霧した後、時間を変えて複合型造粒機内で乾燥した。MP-01 の操作条件を Table 15 に示す。

### (3) 質量中位径 D50 と幾何標準偏差 $\sigma_g$ の変化

Fig.23 に造粒物の質量中位径 D50 および幾何標準偏差  $\sigma_g$  と造粒時間ならびに乾燥時間との関係を示した。

#### 《 造粒過程 》

2つの系のいずれにおいても造粒時間の経過に伴って質量中位径の増加と幾何標準偏差の減少が認められ、粒子が成長し、かつ粒度分布がシャープとなっていることが分かる。一方、造粒過程終了時の質量中位径（プロベネシド系：< 250  $\mu\text{m}$ 、アスコルビン酸系：~300  $\mu\text{m}$ ）の比較から、後者の方が粒子の付着・凝集が容易で、粒子の成長が早いことが分かる。

#### 《 乾燥過程 》

プロベネシド系では、乾燥によって質量中位径の減少が認められた。これは、粒子表面の乾燥により、弱い力で凝集体を形成していた粒子の一部が剥離したものと考えられる。一方、アスコルビン酸系では、

質量中位径は乾燥によっても変化していない。このことから、後者の方が粒子の付着・凝集力が強いことが分かる。

### (4) 主薬および賦形剤含量の変化

造粒時間および乾燥時間を変化させて得られた造粒物を対象に、10種類の粒径範囲にふるい分け、NIRを用いて各粒径範囲に含まれる主薬および賦形剤の含量を測定した。その結果を Fig.24 に示す。

プロベネシド系では、造粒初期（Fig.24(a)、造粒時間  $3.0 \times 10^2$  秒）には、主薬および乳糖の含量がいずれの粒径範囲においても理論値から外れていること、また、粒径範囲によって大きく異なっていることから、まだ均一な状態となっていないことが分かる。造粒中期（Fig.24(b)、造粒時間  $9.0 \times 10^2$  秒）には、主薬の含量は 200  $\mu\text{m}$  以上の粒径範囲でほぼ理論値に等しくなっており、造粒が進行するにつれて含量が均一となってくる様子が分かる。乳糖については、まだほとんどの粒径範囲において理論値から外れた状態にある。造粒後期（Fig.24(c)、造粒時間  $1.6 \times 10^3$  秒）になると、主薬も乳糖も粒径の小さい粒子（未造粒物）を除いて、いずれの粒径範囲でもほぼ理論値に近い含量を示すようになっており、ほぼ均一な状態となっていることが分かる。

アスコルビン酸系をこれと比較してみると、造粒中期（Fig.24(d)、造粒時間  $9.0 \times 10^2$  秒）において、既に主薬、乳糖、コーンスターチのどれをとっても、いずれの粒径範囲でもほぼ理論値に近い含量を示すようになっており、溶解性のよいアスコルビン酸系は含量均一性の点で優れていることが明らかとなった。

また、プロベネシド系の乾燥過程について見てみると、乾燥時間が  $2.4 \times 10^2$  秒（Fig.24(e)）であれば、細粒域（粒径 100~500  $\mu\text{m}$ ）における粒径範囲ごとのばらつきは少ないが、 $6.0 \times 10^2$  秒の乾燥を行った場合（Fig.24(f)）には、粒径の小さい粒子で高い含量を示すようになり、主薬を含む粒子の剥離が示唆される。

### (5) 粒子の成長機構（造粒機構）

Fig.25 に、上記の結果から考察される粒子の付着・凝集モデルを示した。

#### 《 プロベネシド系 》（Fig.25(a)）

プロベネシド系の主薬は、難溶性薬物であるため、粒子の成長速度が遅く造粒されにくい。

造粒初期には、乳糖に主薬あるいはコーンスターチが付着して凝集体を形成するが、コーンスターチは主薬に比べてやや凝集されにくい。造粒中期には、主薬と乳糖からなる凝集粒子にコーンスターチが付着する。粒子同士の付着・凝集と解砕を繰り返しつつ、粒子が成長する。造粒末期には、未造粒物の割合も少なくなり、主薬・乳糖・コーンスターチからなる造粒物が形成される。

乾燥工程では、造粒工程で形成された凝集体の一部、特に主薬が剥離するが、乾燥時間を  $2.4 \times 10^2$  秒までとするなら、主薬の剥離をあまり起こさないで

済む。

#### 《 アスコルビン酸系 》 (Fig.25(b))

アスコルビン酸系の主薬は、溶解性の良い薬物であるため、粒子の成長速度が速く、造粒初期から主薬含量の均一性に優れた造粒粒子が得られる。

造粒初期には造粒されていない主薬が存在するが、造粒中期には主薬と賦形剤からなる凝集体が形成されている。乾燥工程においても、造粒粒子からの剥離はほとんど起っていない。

この造粒工程における造粒機構ならびに含量均一性に優れた造粒物を調製できる操作条件に関する研究は、インラインでの測定が難しいため、一定時間ごとに造粒操作を停止するというオフラインの形で行われている。リアルタイムの測定でないことから、ちょっと地味な感じを与えるが、「種々の分析手段を活用して製造プロセスを解析することによって、医薬品の製造プロセスにおいて何が起きているか、医薬品の品質を担保する上で種々の変動要因のうちのどれがキーとなる要因であるか、その要因をどのようにコントロールすればよいかを明らかにする」という PAT の目的から見て優れた内容をもつものと評価することができる。今後の課題は、こうした研究を実際の製造現場とリンクした形で発展させることであろう。

### C.10 新しい品質規格を用いた製品の評価法

優れた医薬品の国際的な研究開発の促進と患者への迅速な提供を目的として、日米および EU の間で ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) が組織され、新医薬品の承認申請の調和を図るための活動が活発に行われている。その活動の一環として、承認申請のために規制当局に提出される承認申請文書の構成を調和するため、コモンテクニカルドキュメント (医薬品承認申請のための国際共通化資料、CTD) が議論され、平成 12 年に合意された。

この ICH 合意を踏まえ、厚生労働省より平成 13 年 6 月 21 日医薬審発第 899 号「新医薬品の製造又は輸入の承認申請に際し承認申請書に添付すべき資料の作成要領について」(CTD 通知) が発出され、新医薬品の承認申請時に添付すべき資料は平成 15 年 7 月から ICH 合意に基づく本作成要領 (CTD ガイドライン) に従って作成されることとなった。

品質に関する CTD ガイドラインは、承認申請資料の配列順序を示したものであり、「各項の表題に続く文章は、その項の内容を説明したり、明確にしたものにすぎない」と適用範囲の項でされており、各項目に記載すべきデータの種類や程度は各極の方針に依存するというのが基本的な CTD の立場である。本通知の円滑な運用のために、特に品質分野では関連の Q&A (平成 13 年 10 月) 及び概括資料の記載例 (モックアップ) (平成 14 年 7 月) が事務連絡された。

本研究では医薬品の品質評価に資するため、我が国における CTD ガイドラインに基づいて作成され

る承認申請資料を検討し、CTD が品質評価に与える影響を検討した。

### C.10.1 CTD ガイドラインの概要

(1) CTD ガイドラインで規定する承認申請資料の構成

CTD ガイドラインでは提出すべき資料は 5 つのレベル(第 1 部～第 5 部)から構成される (Fig.26)。もっとも上位 (第 1 部) に位置するものは各規制当局によって指定される行政情報であり、CTD の対象外とされている。我が国では第 1 部は承認申請書の写し、各種証明書類、添付文書案等により構成される。第 2 部は従来の資料概要に相当する部分であり、品質、非臨床、臨床の各分野の概括がなされる。第 3 部から第 5 部までが各分野の文書あるいは試験報告書であり、第 3 部が品質に関する文書に相当する。

従って、CTD ガイドラインに従った承認申請であっても、従前通り承認申請書が存在することには代わりはない。

(2) CTD ガイドライン (品質) の適用範囲

本ガイドラインでは冒頭で「本ガイドラインは ICH ガイドライン Q6A (以下「新規化学薬品」という) 及び Q6B (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品、以下、「生物薬品」という) の適用範囲において定義される原薬およびその製剤に係わる申請資料の様式 (項目と配列順序) に関する指針を示すことを目的とするものである」と記載されている。Table 16 に示すように新規化学薬品にあつてはポリペプチド類や生物薬品については従来型のワクチン等は本来対象とされない。

しかし、引き続き文章で「上記以外にも適用可能な場合もあるので、(途中省略) 規制当局に相談の上、その適用の可否を判断すること。」とあり、適用範囲は事実上各極に委ねられた。我が国では原則としてすべての新医薬品を対象とすることとされた。

従って、例えば、Q6B では対象とされていない従来型のワクチンもわが国では CTD の対象となる。CTD ガイドラインが参照することとしている関連のガイドライン (Q5A-D) の中にもワクチンを対象外としているものもあり、記載すべき事項についてはケースバイケースの判断が必要とされる。

(3) CTD ガイドライン (品質) の構成

CTD ガイドライン (品質) で規定されている大項目と配列を Table 17 に示す。

従来、我が国においては、特に新規化学薬品については最終製品 (原体あるいは製剤ともに) の規格および試験方法で品質を保証するとの立場から添付資料として製造方法に関する記載項目は多くなかったが、CTD ガイドライン (品質) では「製造」が独立した項目として設定された。この項目には次の事項の記載が求められている。①製造業者、②製造方法およびプロセスコントロール、③原材料の管理、④重要工程及び重要中間体の管理、⑤プロセスバリデーション/プロセス評価、⑥製造工程の開発の経

緯、の6項目である。

また、「容器及び施栓系」及び製剤に関しては「製剤開発の経緯」の記載が必要となった。

### C.10.2 我が国におけるCTDガイドライン（品質）の運用

医薬品の品質にかかわる我が国における独自の制度—即ち医薬品の規制が承認と許可の2段階で行われていること、及び承認事項は添付資料の記載事項ではなく、承認申請書に記載された事項であること—から「製造」に関わる資料については別途取扱いが定められている。製造の項目の中から「製造方法およびプロセスコントロール」、「重要工程及び重要中間体の管理」を取り上げて品質評価に及ぼす影響を考察する。併せて容器及び施栓系における記載内容について検討する。

#### (1) 製造方法及びプロセスコントロール

##### a) 製造スケール

我が国では医薬品の承認/許可制度において、「承認」ではその物が医薬品として保健衛生上適当であるかどうかの点について判断される。一方「許可」で申請者がその医薬品を実際に製造する能力があるか否かが判断される。従って承認申請時は必ずしも実生産能力の最終的評価は必要とされていないため、パイロットプラントレベルのデータで申請が認められている。

CTDガイドライン（品質）では本項で原薬、製剤ともに製造方法に関する情報を提示する必要がある。新規化学薬品の場合、原薬では製造工程の流れ図とともに各種条件などを記載すること及び製造工程の一連の操作手順等の情報を記載する必要がある。これらの情報には原材料、溶媒、触媒及び試薬の量、装置、操作条件（温度、圧力、pH、時間等）などが含まれる。このような項目は反応スケールや反応装置の状況に依存して変動する可能性があり、従来我が国では承認を取得した後、製造許可を申請する段階で最終的に設定されていた。

そのため、CTDの運用に当たって、「承認申請書に添付すべき資料は、原則としてパイロットスケール以上で製造された製品の品質の適格性に係るデータに基づき作成する（CTD通知別紙6）」とされ、今まで同様、実生産スケールでの製造に関するデータは必要とされない。ただし、パイロットスケールでの生産と実生産の関係については、「パイロットスケールは想定される実生産データを反映したものであることが必要である」とこと及び「実生産スケールでのデータはパイロットスケールのデータと同等・同質であることを申請者において実証する（CTD通知別紙6）」とされている。

特に生物薬品の品質の恒常性確保には、評価された製造工程が十分な特性解析及び最終製品の規格及び試験方法とともに極めて重要である。製造変更の問題はICH Q5Eにおいて製造変更の際の同等・同質性評価（コンパラビリティ）として議論されているところであり、パイロットスケールで評価すべ

きデータの種類と程度についてはICH Q5Eの議論を今後ふまえる必要があると思われる。

##### b) 出発物質

「製造方法及びプロセスコントロール」項の説明文章の冒頭で、「申請者は、原薬の製造に対して、責任を持つものであり、原薬の製造方法に関して説明する必要がある。」と記載されている。製造方法の説明を開始する化合物（出発物質）の考え方は、ICHガイドライン Q7（原薬GMP）の考え方とは異なり、原薬の品質に影響を与える工程から記載する必要がある（平成13年10月22日厚生労働省審査管理課事務連絡「新医薬品の製造又は輸入の承認申請に際し承認申請に添付すべき資料の作成要領に関するQ&Aについて」）。従って、本稿で記載される製造工程は必ずしもGMPがかかる工程と一致するとはかぎらず、さらに初期段階から説明しなければならない場合もあり得る（Fig.27）。

一方、新規化学薬品原薬では、「特性」の大項目の中項目「構造その他の特性解析」に合成経路を記載して、構造決定の説明資料とする。従って、ここでの記載はむしろ、立体構造や異性体存在の可能性等について説明することを目的し、それらが説明できる化合物から説明する必要があることから、より早い段階の化合物から記載する場合があります。もしれない。

#### (2) 重要工程・重要中間体の管理

製造工程の中で重要工程に関しては、工程が適切に管理されていることを保証するために実施される試験方法及び判定基準を記述することが必要である。重要工程としては、無菌工程、再加工程、ウイルス不活性化工程・除去工程、規格及び試験方法を設定した工程の他、適切な管理をするために申請者が定めた工程が相当する。

重要中間体には製造工程で単離される中間体、規格および試験方法が設定されている中間体および処置基準値等で管理しているものでも申請者が重要と判断している中間体が該当する。CTDガイドライン（品質）の重要中間体の説明箇所では、単離される中間体について品質および管理方法を記述する旨の例示がなされているが、それ以外の重要中間体、例えば、「製造方法及びプロセスコントロール」の項の記述にあるように、規格及び試験方法を設定した重要中間体やプロセスコントロールの対象とする重要中間体に関する品質及び管理方法の詳細も必要に応じて本項に記載することが必要であろう（Fig.28）。

#### (3) 容器及び施栓系

現在の添付資料では、容器及び施栓系に関しては特殊な場合を除き簡単にしか記載が求められていなかった。また、固形内服製剤については平成12年2月8日医薬審第39号により申請書に簡略記載が認められ、添付資料においてもきわめて簡単な記載にとどまっている。

CTDガイドライン（品質）では記載すべき事項の

例が以下のように示された。即ち、「容器及び施栓系について、一次包装を構成する各素材を明らかにすることを含め、記述する。また、容器及び施栓系の規格及び試験方法を記述する。規格及び試験方法には外観・性状及び確認試験（その他、重要と思われるものについては、適宜、寸法を図示すること）が含まれる。必要に応じて、公定書にない試験方法を含め、そのバリデーションとともに示すこと。」とされた。

最近、複数の製剤に関して安定性試験を実施する際に両極端を評価することにより中間の製剤の安定性が評価できるとするブラケット法のガイドラインが作成された（ICH Q1D）。製剤が両極端であるか否かの判定には容器及び施栓系の評価が重要である。同ガイドラインでは以下のように記載されている。

「ブラケット法は、他の条件が一定で容器サイズもしくは容れ目だけが異なる同じ容器施栓系に適用することができる。しかしながら、容器サイズと容れ目違いの両方について同時にブラケット法を適用しようとした場合、最も大きい容器と最も小さい容器がすべての包装仕様の両極端であると推測すべきではない。両極端を選択するに際しては、特に注意が必要であり、製品の安定性に影響すると考えられる容器施栓系の様々な特性を比較して行われるべきである。この特性とは、容器の壁の厚み、施栓の構造、容量対表面積率、容量対空隙率、単位投与量又は単位容れ目量あたりの透湿速度又は酸素透過速度等を必要に応じて考慮すべきである。」

ブラケット法を安定性試験に取り入れる場合には、下線部を付した事項に関して本項に十分な記載が必要である。

### C.11 新しい品質評価基準の公定規格への反映－薬局方国際調和－

薬局方は、我が国のみならず欧米諸国においても、医薬品の品質評価基準の基本とされているものであり、その国際調和は医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に少なからぬ影響を及ぼすものである。

日米欧の薬局方国際調和は、ICHに先立ち、1990年に日米欧の薬局方の自主的な活動として開始され、一般試験法（理化学試験法、製剤試験法、微生物関連試験法、物性試験法及びバイオ医薬品関連試験法）及び医薬品添加剤各条について、13年余りにわたり継続されている。

本研究は、薬局方国際調和の最近の動向を調査、整理し、国際的動向を踏まえた医薬品品質評価に欠くことの出来ない日本薬局方の国際化の推進に資することを目的として行った。

#### C.11.1 薬局方国際調和の概要

薬局方調和は、日米欧の薬局方が1990年2月に会合して薬局方検討会議（Pharmacopoeial Discussion Group, PDG）を組織して以来、ほぼ半年毎に会合を持ち、薬局方調和の方針、手順、調和

項目の選定等薬局方調和の推進に必要な事項を協議するとともに、調和項目別の調和進捗状況を確認し、より効率的な薬局方調和の推進を図っているものである。

薬局方調和は、医薬品添加物各条の調和に始まり、その後原薬及び製剤の試験に用いられる一般試験法にも対象を拡大し、微生物試験法、理化学試験法、製剤試験法、物性試験法、生物薬品関連試験法の調和が進められている。一般試験法の中のICH品質規格ガイドライン（Q6A Guideline）策定に関連して医薬品業界団体からの強い調和要望があった試験法のうち規制当局の関与が不可欠な事項については、ICH品質専門家会合の下に組織されたタスクフォースとの協調の下に調和が検討された。

薬局方国際調和の第一段階ともいえる当初の約10年間は、試行錯誤期間ともいうべき期間であり、関係者の努力にもかかわらず、各薬局方が置かれている環境やその編纂方針の大きな違いが障害となり、調和の成果がほとんど形に現れることなく経過し、PDGは薬局方利用者から十分な成果が見られないとの評価を受けることとなった。PDGは、調和推進を図るため、必ずしもそれまでの全面的な調和にこだわることなく、調和が困難な部分を明示的に除外した部分的調和（Harmonization by attribute）を取り入れる現実的な方策を取り入れ、薬局方国際調和の成果を上げつつある。

なお、薬局方調和は、原則として専門家の会合によることなく、薬局方間の文書による意見交換によりPDGにおいて合意された手順に沿って進められ、PDG会合において進捗状況を確認し、調和の推進に必要な措置をとることとしているが、文書交換では調和困難な問題については、必要に応じて専門家会合が開催されている。

薬局方調和の方針、手順、及び調和の現状は、次のとおりである。

#### C.11.2 薬局方国際調和の方針

国際調和の方針を内外に示すためにPDGは1994年に「薬局方国際調和の方針」をまとめ、公表し（日本薬局方フォーラム4巻4号65頁）、PDGによる薬局方国際調和は、各薬局方の考え方、試験方法、判定基準、医薬品各条を一致させることが最終目的であり、その重要性は認識するが、一致が困難な現実を踏まえ「調和(harmony)であり、必ずしも一致(unison)ではない」とし、一致に到達できない場合には、客観的な同等性(objective comparability)と薬局方間の差異を明確にして調和するとした。しかし、その後の調和の実践経験から「全面調和」に加えての「部分的調和」の採択のみならず、PDG、各薬局方及びそれらの環境にも様々な変化があり、薬局方国際調和の現状に整合しない面も生じているのとの認識に基づき、2002年に見直しを開始した。

主な見直し点には、「客観的な同等性」の理解に幅があり、調和事項を局方改正に反映した後の薬局方間互換性(Interchangeability)に問題を生じかねないことから2000年6月に「医薬品の適否判定に



差異を生じない試験結果が得られること」を判断基準として調和することを申し合わせ、これを「PDG 調和の定義」として明文化すること、及び薬局方利用者や ICH 運営委員会から質問が頻発する Interchangeability に関する見解を整理することである。

PDG による調和は、” A pharmacopoeial general chapter or other pharmacopoeial document is harmonised when a substance or preparation tested by the harmonised procedure yields the same result and the same accept/reject decision is reached.” と定義し、Interchangeability については、PDG による薬局方国際調和は、規制当局による調和薬局方の相互受入れの科学的な根拠を提供するもの (provides a basis for interchangeability) であると位置付けた。

調和方針の改定は、2003 年 2 月にほぼ成案を得たが、最終的な確定は 2003 年 7 月の次回 PDG 会議に持ち越された。

なお、薬局方国際調和の透明性の確保については、調和案を各薬局方の定期刊行物に掲載し、周知をはかるとともに、調和案に対する薬局方利用者の意見を集め、調和に反映することとしている。また、我が国においては、合意署名文書は写真版で日本薬局方フォーラムに掲載されている。

### C.11.3 薬局方調和の手順

薬局方国際調和は 1999 年 4 月に改定合意された手順に従って進められて来たが、調和の迅速化を図るとともに、最近取り入れられた部分的な調和を明記することなどが検討され、2002 年 9 月に再改定が合意され、手順が改められた。

本改定により変更となった手順は、調和案の公表に関するものである。これまでは調和案として Proposal Draft (Stage 3 Draft) 及び Official Inquiry Draft (Stage 4 Draft) を公表し、薬局方利用者の意見を聴取してきたが、Stage 3 Draft については、各薬局方の専門家委員会の検討に止め、公表を廃止することとなった。調和案の公表は薬局方国際調和の透明性の確保に重要であるが、より完成度の高い Stage 4 Draft を公表することがより効果的であり、同時に調和に要する期間の短縮に繋がることの判断に基づくものである。

前回の手順改定後に「全面調和」が困難な場合には「部分的調和(Harmonization by attribute)」を採用することとなったが、その場合の手順が追加され、合意署名文書の書式についても明記されることとなった。

各項目の調和に要する連絡調整は PDG が項目毎に指定する薬局方 (Coordinating Pharmacopoeia, CP) が担当することとされている。なお、PDG が関与するのは試験法あるいは各条の調和文書に合意署名する Stage 5 迄であり、調和内容を各薬局方改正に反映する Stage 6 以降は、各薬局方がそれぞれの薬局方所定の改正手順により進めることとされている。

2002 年 9 月に再改定が合意された PDG 手順は次のとおりである。

#### (1) 薬局方調和手順

Stage 1, Identification : 薬局方調和項目選定

PDG は、薬局方国際調和項目を選定し、CP を指定する。

Stage 2, Investigation : Proposal Draft (Stage 3 Draft) 作成

CP は、担当項目につき、日米欧の薬局方を比較検討の上、必要な調査・研究を実施し、国際調和第一次案である Proposal Draft (Stage 3 Draft) を作成し、その設定根拠等の説明を付して他の薬局方事務局に送付する。

Stage 3, Proposal for Expert Committee Review : Official Inquiry Draft (Stage 4 Draft) 作成

各薬局方事務局は、それぞれの専門家集団に Stage 3 Draft 及びその付属文書を回付し、検討を依頼する。事務局は 2~4 ヶ月以内に専門家の意見を回収し、2 ヶ月以内に各薬局方の集約意見を、CP に送付する。(薬局方事務局が Stage 3 Draft を受領してからコメントを提出するまでの期間は最大 6 ヶ月である。)

CP は、各薬局方のコメントを検討し、第二次案である Official Inquiry Draft (Stage 4 Draft) を作成し、必要な説明を付して他の薬局方事務局に送付する。

Stage 4 Draft の記載様式は、できるだけ CP 固有の記載様式を排除した “global style” とする。

Stage 4, Official Inquiry : Draft Harmonized Document (Stage 5A Draft) 作成

各薬局方事務局は CP から送付された Stage 4 Draft 及びその解説をそれぞれの薬局方機関誌 (EP: Pharmeuropa, JP: 日本薬局方フォーラム (JPF), USP: Pharmacopoeial Forum。以下「フォーラム」という) の直近号に掲載し、薬局方利用者コメントを求める(コメント期間: 4~6 ヶ月)。なお、Stage 4 Draft の掲載に当たっては読者の便を図るため、翻訳を付加したり、各薬局方独自の表記スタイルに編集して掲載することができる。

各薬局方事務局は薬局方利用者コメントを検討し、コメント受理後 2 ヶ月以内に、集約したコメントを CP に送付する。(Stage 4 Draft をフォーラムに掲載してからコメントを提出するまでの期間は最大 8 ヶ月である。)

CP は、各薬局方のコメントに基づき必要な修正を加えた調和文書案 Draft Harmonized Document (Stage 5A Draft) を作成し、説明を付して他の薬局方事務局に送付する。

Stage 5, Consensus : 調和合意

Stage 5A, Provisional : Consensus Document (Stage 5B document) 作成

各薬局方事務局は CP から送付された Stage 5A Draft を、調和合意に向けての最善の考慮を払い検討し、その受け入れ可否及び修正意見を 4 ヶ月以内に CP に連絡する。

三薬局方の合意に至らない場合には、CP は修正意見を考慮した改定調和文書案(Stage 5A/2 Draft)を作成し、各薬局方に送付する。各薬局方事務局は受け入れ可否を 2 ヶ月以内に CP に報告する。この調和文書改定作業を 3 薬局方の合意が得られるまで繰り返す。

この段階で CP が全面的な調和が困難であると判断した場合には、部分的な調和 (Harmonization by attribute) を採用することができる。この場合には、調和署名文書には調和した事項 (Harmonized attributes/provisions) のみを記載し、非調和事項 (Non-harmonized attributes) 及び特定の薬局方のみが規定する事項 (Local attributes) は記載しない。また調和署名文書の表紙には、調和合意の状況を記載した所定の書式を用いる。

Stage 5B, Draft sign-off: Consensus Document (Stage 5B document) 合意署名

Stage 5A の合意を受け、直近の PDG 会議において調和合意署名する。

合意文書の事前確認のため、CP は合意署名文書案となる Stage 5B Document を PDG 会合の 4 週間前までに各薬局方に送付する。

PDG 会議における合意署名により PDG の作業は終結し、合意結果を反映した薬局方改正と施行は各薬局方に委ねられる。

Stage 6, Adoption: 各薬局方改正

各薬局方は、それぞれの所定手順により、合意文書の内容を直近の改正または追補に反映する作業を進める。

薬局方収載にあたり、合意事項及び未調和事項以外の事項を規定する場合 (Local attribute) は、それを PDG に報告する。

Stage 7, Implementation: 国際調和施行

日米欧 3 薬局方の全てに PDG 合意内容が反映されている段階である。

## (2) 調和後の改定手順

(1) の手順により合意が成立した事項の改定は合意した手順に従うこととされており、各薬局方が独自に (勝手に) 修正を行うことはできない。

改定提案を認めうるものとして次のような場合が挙げられている。

- ・公衆衛生または安全性に係る理由がある場合
- ・現行規格に適合する製品の入手が困難となった場合
- ・試薬の入手が不可能な場合
- ・新規の製造法による製品が現行規格に適合しなくなる場合
- ・より優れた試験方法に変更する場合

調和改定の提案は、PDG に改定理由と改定内容を提案し、PDG の合意と CP の指名により、調和手順の Stage 2 (Stage 3 Document の作成) から開始することとされている。なお、緊急を要する場合などには、PDG の合意により手順が簡略化できることとされている。

## C.11.4 薬局方調和の現況

薬局方調和は、既収載項目の調和 (Retrospective harmonization) と未収載項目の調和 (Prospective harmonization) の両面にわたって進められている。前者は医薬品添加物各条及び一般試験法の調和であり、後者は生物薬品関連試験法である。Prospective harmonization としてバイオ医薬品各条の調和提案もあったが、立ち消え状態となっている。

医薬品添加物各条の調和は、医薬品製剤の国際的流通の円滑化に資するとの考え方により薬局方調和の最優先課題として PDG が先ず採り上げたものであり、約 50 品目について調和が進められている。各薬局方の各条制定方針の相違もあり調和が難航したが、Harmonization by attribute の採用により、19 品目が調和合意され、2003 年 2 月には 10 品目が新規の調和項目に選定された。

一般試験法の調和は、医薬品添加剤各条の調和過程において必要性が認識され、採択されたものである。対象分野は、理化学試験、微生物関連試験、製剤試験、物性試験、生物薬品関連試験法にわたり、約 30 の試験法について調和が進められている。ICH による Q6A ガイドライン策定に伴い 11 の試験法の調和が PDG に付託され、このうちの 5 試験法 (Dissolution, Disintegration, Microbial contamination, Uniformity of content, Uniformity of Mass) の判定基準に関する部分は ICH 品質分科会タスクフォースによる調和合意事項が PDG に提供されている。

生物薬品関連試験法は、薬局方既収載項目の調和とは異なり、未収載項目の調和に該当するものである。各薬局方に収載された後の調和には既収載であるが故の種々の困難が経験されたことから、収載前に調和をはかることにより効率的な薬局方調和を期待し、採択されたものである。

2003 年 2 月初旬現在の 3 局の調和合意署名に至ったものは、下記の 11 試験法及び 19 医薬品添加物各条であり、調和項目の約 3 分の 1 が調和されたことになる。(末尾は署名年月である。)

試験法:

- ・ Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE): 1999 年 10 月
- ・ Bacterial Endotoxin Test: 2000 年 1 月
- ・ Test for Extractable Volume of Parenteral Preparations: 2000 年 7 月
- ・ Test for Particulate Contamination: Sub-visible Particles: 2000 年 7 月
- ・ Residue on Ignition/Sulphated Ash Test: 2000 年 11 月、改定: 2002 年 9 月
- ・ Sterility test: 2002 年 9 月
- ・ Amino acid determination: 2002 年 9 月
- ・ Capillary electrophoresis: 2002 年 9 月
- ・ Isoelectric focusing: 2002 年 9 月
- ・ Protein determination: 2002 年 9 月
- ・ Peptide mapping: 2002 年 9 月